



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2016

**SARA PATRÍCIA
ROCHA FERREIRINHA** **DESENVOLVIMENTO DE SUPLEMENTOS LÍQUIDOS
COM VITAMINAS E MINERAIS PARA ALIMENTAÇÃO
ANIMAL**



**SARA PATRÍCIA
ROCHA FERREIRINHA**

**DESENVOLVIMENTO DE SUPLEMENTOS LÍQUIDOS
COM VITAMINAS E MINERAIS PARA ALIMENTAÇÃO
ANIMAL**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, com especialização em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Engenheiro João Almeida, da DIN, SA.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmã e ao João pelo incansável apoio durante os meus anos de vida académica.

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva

Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem o incondicional apoio da minha família e amigos. Claramente tendo em conta o curto espaço desta secção não poderei agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir e a cumprir os meus objetivos nesta grande etapa da minha vida.

Aos meus pais e irmã por todo o amor e por acreditarem sempre em mim. Com o término desta etapa espero de alguma forma retribuir todo o carinho e apoio que me depositam constantemente. Todo o trabalho e esforço é dedicado a eles.

À melhor pessoa, ao melhor amigo, João. Sem ele nada disto teria sido possível. Um enorme obrigada por aturar todos os meus desabafos constantes, por estar sempre do meu lado, por me ajudar em tudo e por me dar um apoio incondicional. Sempre acreditou em mim, mais do que eu própria, nunca me deixou desistir. Foste o maior pilar, do fundo do coração, um enorme obrigada.

À professora Ivonne pela sua orientação, pelo seu apoio, pela disponibilidade e por todo o conhecimento que me transmitiu. Por toda a ajuda na elaboração deste trabalho.

À Rosa por toda a experiência e conhecimento que me transmitiu no laboratório da DIN, por estar sempre disposta a ajudar e acima de tudo por ter acreditado e confiado em mim. A todo o incentivo e ao estímulo de desafios na realização deste trabalho, um muito obrigada.

Aos meus colegas de laboratório que tão bem me receberam e me ajudaram, por toda a amizade e carinho.

palavras-chave

Suplementos, vitaminas, minerais, estabilidade, maltodextrinas, goma acácia.

resumo

No âmbito deste trabalho, realizado sobre a forma de estágio na DIN, SA, desenvolveram-se suplementos líquidos com vitaminas hidro e lipossolúveis e minerais. Estes compostos são essenciais ao desenvolvimento adequado dos animais e a suplementação tem sido cada vez mais utilizada devido à crescente taxa metabólica em animais de alta produção. A metodologia de dispersão utilizada nas vitaminas lipossolúveis foi o encapsulamento com biopolímeros, sendo que estas vitaminas já foram adquiridas nesta forma. Estes biopolímeros foram caracterizados quimicamente, onde se fez uma análise de açúcares neutros por GC-FID e uma análise das ligações glicosídicas por GC-MS. Daqui concluiu-se que a vitamina A possivelmente estava envolvida numa matriz de goma acácia e maltodextrinas e a vitamina D3 em maltodextrinas e proteínas. A caracterização da vitamina E foi feita por FTIR onde se verificou que estava dispersa em sílica. No que toca à estabilidade química verificou-se que a vitamina E foi a que se demonstrou menos estável sendo que as vitaminas A e D3 se apresentaram mais estáveis. O suplemento contendo vitaminas hidrossolúveis e minerais também se demonstrou instável ao longo do tempo de armazenamento. A presença da vitamina C levou à formação de precipitados após a junção de selenito e assim teve que ser retirada da formulação. Foi a vitamina B2 que sofreu uma maior destruição seguida da vitamina B9. A vitamina B3 apresentou-se estável ao longo do tempo de armazenamento. Fatores com a luz e O₂ influenciam a estabilidade deste produto. Assim conclui-se que estes produtos necessitam de mais investigação com intuito de aumentar a sua estabilidade.

keywords

Supplements, vitamins, minerals, dispersion in water, stability, maltodextrin, gum acacia

abstract

In this work, liquid supplements were developed with vitamins and minerals. These compounds are essential nutrients for the proper development of animals and supplementation has been increasingly used because of the increasing metabolic rate in high production animals. The dispersion methodology used for liposoluble vitamins was the encapsulation with biopolymers, and these vitamins have already been acquired in this form. The encapsulated liposoluble vitamins were chemically characterized by neutral sugars analysis by GC-FID and glycosidic bond analysis by GC-MS. Hence it was concluded that vitamin A was involved in gum acacia and maltodextrins and vitamin D3 in maltodextrins and proteins. The characterization of vitamin E was done by FTIR where it was found that it was dispersed in silica. As regards to chemical stability, vitamin E was found to be less stable while vitamins A and D3 presented as most stable. The supplement containing water-soluble vitamins and minerals has also been shown to be unstable throughout storage time. The presence of vitamin C led to the formation of precipitates and thus had to be removed from the formulation. Vitamin B2 was suffered higher destruction followed by vitamin B9. Vitamin B3 presented stable over storage time. Factors like light and O₂ influence the stability of the product. Thus, it is concluded that these products require further investigation in order to increase their stability.

Índice

Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	XII
Abreviaturas	XIII
Capítulo 1 – Introdução	1
Preâmbulo	1
1.1. Importância de vitaminas e minerais na alimentação animal	1
1.1.1. Vitaminas lipossolúveis na alimentação animal	1
1.1.2. Vitaminas hidrossolúveis na alimentação animal.....	4
1.1.3. Minerais na alimentação animal	6
1.2. Formulações de dispersão de vitaminas em água para alimentação animal	8
1.2.1. Emulsões.....	9
1.2.2. Encapsulamento à base de biopolímeros	11
1.3. Estabilidade de vitaminas em suplementos	13
1.3.1. Estabilidade das vitaminas lipossolúveis.....	13
1.3.2. Estabilidade de vitaminas hidrossolúveis	16
Capítulo 3 - Material e métodos	25
3.1. Preparação dos produtos líquidos	27
3.2. Análise de açúcares neutros (GC-FID)	27
3.2.1. Hidrólise	28
3.2.2. Redução e acetilação	28
3.2.3. Análise por GC-FID	29
3.3. Análise das ligações glicosídicas (GC-MS).....	29
3.3.1. Reação de metilação	29
3.3.2. Hidrólise, redução e acetilação	30
3.3.3. Análise por GC-QMS	30
3.4. Análise das vitaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ..	31
Capítulo 4 - Resultados e discussão	33
4.1. Vitaminas lipossolúveis	35
4.1.1. Análise de açúcares neutros e ligações glicosídicas.....	35
4.1.2. Caracterização por FTIR	39
4.1.3. Estabilidade química.....	42
4.2. Vitaminas hidrossolúveis e minerais	46

4.2.1.	Desenvolvimento inicial do produto.....	46
4.2.2.	Influência do precipitado nas vitaminas	48
4.2.3.	Estudo da estabilidade das vitaminas hidrossolúveis em meio aquoso	50
Capítulo 5 – Conclusão e perspectivas futuras		57
Capítulo 6 – Referências bibliográficas		61
Capítulo 7 – Anexos.....		69
Anexo I- Cromatogramas dos padrões das vitaminas hidrossolúveis.....		71
Anexo II- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em t=0... 73		73
Anexo III- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=1 75		75
Anexo IV- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=2 77		77
Anexo V- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=3 . 79		79
Anexo VI- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=4 81		81
Anexo VII- Cromatogramas dos padrões das vitaminas lipossolúveis.....		83
Anexo VIII - Cromatogramas da análise do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=0.....		84
Anexo IV- Cromatogramas da análise do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=1		85
Anexo V - Cromatogramas da análise do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=2.....		87

Índice de figuras

Figura 1- Esquematização de uma emulsão com um agente emulsificante (lado esquerdo) e com um polímero (lado direito). Adaptado de (44)	9
Figura 2- Oxidação da vitamina E na presença de O ₂ . Adaptado de (69).	14
Figura 3- Destruição da vitamina E na presença de luz, com formação de uma quinona. Adaptado de (69).	14
Figura 4- Via de oxidação da vitamina A palmitato na presença de luz e O ₂ , levando à formação de (a)- α -ionona e (b)- 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona. Adaptado de (71).	14
Figura 5- Via de degradação do ácido ascórbico em solução aquosa. (1)- ácido ascórbico; (2)- ácido desidroascórbico; (3)- ácido 2,3-dicetogulônico Adaptado de (79).	16
Figura 6-Via de oxidação do ácido ascórbico catalisada pelo ferro (Fe ³⁺) com consequente produção de ROS. Adaptado de (81)	17
Figura 7- Reação de fotodegradação da riboflavina (Rf) na presença da luz e oxigênio (O ₂) com formação de oxigênio singuleto (imagem superior). Formação da riboflavina no estado tripleto (imagem inferior) . Adaptado de (65).....	17
Figura 8-Eschema da via de degradação do ácido fólico na presença de luz e oxigênio em meio ácido. 1- ácido fólico; 2-formação da enamina; 3- 6-formilpterina; 4- ácido α -aminobenzoil-L-glutâmico; Adaptado de (86)	18
Figura 9- Esquema dos vários componentes de um cromatografo de HPLC. Adaptado de (89)	20
Figura 10- Estrutura da goma acácia. G- galactose,U-ácido glucurônico, Ap-arabinopirranose, A-arabinose, Um- ácido 4-O-metilglucurônico. Circulo a verde e vermelho dizem respeito à ligação(1 \rightarrow 3,6)-Gal.	39
Figura 11- Espectro obtido por FTIR da amostra AmA na região dos 4000 a 600 cm ⁻¹ . 40	
Figura 12- Espectro obtido por FTIR da amostra AmD3 na região dos 4000 a 600 cm ⁻¹	41
Figura 13- Espectro obtido por FTIR da amostra AmEF na região dos 4000 a 600 cm ⁻¹ .42	
Figura 14- Percentagem remanescente das vitaminas, A, D3 e E, ao longo de 2 meses.43	
Figura 15- Cromatograma do padrão da vitamina E (lado esquerdo). Cromatograma do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=2 (imagem do lado direito) 290 nm....	45
Figura 16- Esquema de dissolução da vitamina C com os minerais. A- Vitamina C dissolvida em água destilada. B- Junção de selenito de sódio à solução de vitamina C. C- Adição de cobre à solução de vitamina C e selenito de sódio.....	47
Figura 17- Mecanismo de redução do selenito na presença de VC. Adaptado de (99,100)	47
Figura 18- - Percentagem de vitaminas remanescente no produto (sem adição de VC) ao longo do tempo. T=0 - após produção; T=1 - análise no mês 1; T=2 - análise no mês 2; T=3 - análise no mês 3; T=4 - análise no mês 4. As barras no gráfico dizem respeito aos desvios padrões.....	51
Figura 19- Fotoclivagem da riboflavina na presença de luz originando luminoflavina. Adaptado de (108).	53
Figura 20- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B1. λ =245 nm	71
Figura 21- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B2. λ =265 nm	71

Figura 22- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B3. □=220 nm.....	72
Figura 23- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B6. □=220 nm.....	72
Figura 24- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B6. □=280 nm.....	73
Figura 25 - Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.....	73
Figura 26- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm.....	74
Figura 27- - Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.....	74
Figura 28- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.....	75
Figura 29- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.....	75
Figura 30- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.....	76
Figura 31- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm.....	76
Figura 32- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.....	77
Figura 33- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm.....	77
Figura 34- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.....	78
Figura 35 - Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.....	78
Figura 36- Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm.....	79
Figura 37- Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.....	79
Figura 38 - Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.....	80
Figura 39 - Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.....	80
Figura 40 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.....	81
Figura 41 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm.....	81
Figura 42 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.....	82
Figura 43 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.....	82
Figura 44- Cromatograma representativo do padrão da vitamina D3. □=265 nm.....	83
Figura 45- Cromatograma representativo do padrão da vitamina A. □=325 nm.....	83
Figura 46 - Cromatograma representativo do padrão da vitamina E. □=290 nm.....	84
Figura 47- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=325 nm.....	84

Figura 48- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=265 nm.....	85
Figura 49- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=290 nm.....	85
Figura 50- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=325 nm.....	86
Figura 51- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=265 nm.....	86
Figura 52- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=290 nm.....	87
Figura 53- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=325 nm.....	87
Figura 54- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=265 nm.....	88
Figura 55- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=290 nm.....	88

Índice de tabelas

Tabela 1- Gradiente de eluição utilizado na separação das vitaminas hidrossolúveis. Adaptado de (90).	31
Tabela 2- Análise de açúcares das diferentes amostras contendo vitamina A, D3 e E, por GC-FID.....	35
Tabela 3-Análise das ligações glicosídicas dos polissacarídeos por GC-MS.	38
Tabela 4- Percentagem de perda da vit. C, B1, B3 e B6 no produto com e sem vitamina C. N.P- não se detetou pico referente à vitamina C.....	49
Tabela 5- Percentagem remanescente das vitaminas ao longo do tempo de armazenamento, seguida do valor do desvio padrão.	51

Abreviaturas

1,25VD3 - 1,25-di-hidroxicolecalciferol

CrEL – cremofor EL

DT – discondroplasia tibial

GA- Goma acácia

GPx – glutathione peroxidase

LRAT – lecitina-retinol aciltransferase

MD- Maltodextrinas

ME – microemulsões

MK-N – menaquinona N

NE – nanoemulsões

O/W – *oil in water* (óleo em água)

PC - fosfatidilcolina

PEM – poliencéfalomalacia

RA – ácido retinóico

ROS – espécies reativas de oxigénio

SCC- contagem de células somáticas

SOD – superóxidos dismutase

TMP – monofosfato de tiamina

TPP – pirofosfato de tiamina

TR – recetores específicos de sabor

TTP – trifosfato de tiamina

VA – vitamina A

VD – vitamina D

VD3 – vitamina D3

VDR – recetores da vitamina D

VE – vitamina E

VK – vitamina K

VK3 – vitamina K3

VL – vitaminas lipossolúveis

VLDL – *very low density lipoprotein*

(lipoproteínas de muito baixa densidade)

Capítulo 1 – Introdução

Preâmbulo

Uma alimentação equilibrada é essencial para o crescimento e bem-estar dos animais. Tendo em conta o crescimento da população e o elevado consumo de carnes torna-se crucial manter uma nutrição adequada nos animais. Uma estratégia cada vez mais utilizada é a utilização de suplementos alimentares que melhoram a produtividade, atendendo à necessidade da produção sustentável. O intuito deste trabalho é desenvolver suplementos líquidos para alimentação animal, em parceria com a empresa DIN, SA. Um suplemento contendo vitaminas lipossolúveis para suínos e aves e outro com vitaminas hidrossolúveis e minerais para ruminantes.

1.1. Importância de vitaminas e minerais na alimentação animal

Os nutrientes, dependendo da quantidade em que devem ser ingeridos, são classificados como micro ou macronutrientes. As vitaminas são micronutrientes e são classificadas, de acordo com a sua solubilidade, em vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis. No grupo das vitaminas hidrossolúveis estão incluídas as vitaminas do complexo B e a vitamina C, enquanto no grupo das vitaminas lipossolúveis incluem-se as vitaminas A, E, D e K (1). Estas vitaminas desempenham papéis importantes no desenvolvimento dos animais, sendo essenciais nos sistemas de defesa antioxidante contra o *stress* oxidativo em animais, no melhoramento do sistema imune, bem como no seu desenvolvimento (2,3). Os minerais têm, também, uma importância na nutrição animal funcionando como co-fatores de enzimas antioxidantes (4). Assim, a ingestão adequada destes nutrientes é essencial, no entanto fatores como a biodisponibilidade do nutriente e a presença de doença podem incrementar os níveis necessários dos nutrientes para o desempenho e reprodução ideal dos animais (5). A suplementação é então uma alternativa promissora para responder às necessidades nutricionais dos animais e torna-se uma estratégia para otimizar o bom desenvolvimento dos mesmos.

1.1.1. Vitaminas lipossolúveis na alimentação animal

As vitaminas lipossolúveis, A, E, D e K desempenham papéis essenciais na nutrição animal. A importância destas vitaminas na alimentação animal tem sido cada vez mais

estudada nos animais tendo em conta o melhoramento do sistema imune associado à diminuição do *stress* oxidativo (6), estando implicados na maior taxa de crescimento e controlo de doenças (7,8).

A vitamina A (VA) apresenta diferentes formas químicas onde se inclui o retinol, retinal, ácido retinóico e os ésteres de retinilo (6,9). É o retinal que está envolvido no processo de visão e, quando o 11-cis-retinal se combina com a proteína opsina, há produção de rodopsina (9). Na ausência da VA não ocorre produção de rodopsina comprometendo o processo de visão. A VA está envolvida no melhoramento dos sistemas de defesa antioxidantes contra o *stress* oxidativo bem como do sistema imune em animais (3,6). Ma *et al.* (6) demonstraram que a suplementação de VA em dietas de animais aumenta significativamente a atividade da glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), enzimas antioxidantes endógenas. Estudos mais recentes corroboram estes resultados, uma vez que se verificou um aumento da atividade da GPx, SOD e catalase em vacas suplementadas com 220 IU/Kg quando comparado com o controlo (110 IU/kg) (3). Assim estes estudos (3,6) sugerem que a VA estimula a ação de enzimas endógenas antioxidantes, sendo fundamentais para a homeostasia do organismo.

A deficiência em VA pode comprometer vários aspetos da resposta imune em animais, resultando num aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas (10,11). Anastasia *et al.* (11) analisaram a influência da VA na resposta imune de porcos, na presença de *rotavírus*, tendo verificado que os animais com deficiência em vitamina A apresentaram diarreia mais severa quando comparados com os porcos que receberam suplementação (100000 IU/kg). Sukmar *et al.* (10) obtiveram resultados idênticos e observaram que a VA influencia a ação da vacina contra o *rotavírus* em porcos. A suplementação com 100000 IU/kg, após administração da vacina, levou a que todos os porcos ficassem sem diarreia, já no caso de défice de VA apenas 25% dos porcos não apresentaram diarreia. (10).

A vitamina E (VE) é um nutriente essencial no organismo estando envolvida na melhoria da função imune, na reprodução, na ação antioxidante e estimula o crescimento dos animais (12,13). Existem dois grupos de VE na natureza, os tocoferóis e tocotrienóis, diferenciando-se pela presença de duplas ligações na cadeia linear (12). O α -tocoferol é a molécula mais ativa e normalmente a nível comercial aparece na forma de acetato. A suplementação com esta vitamina leva a um incremento da produção de espermatozoides e a um

aumento da motilidade e viabilidade do mesmo (13,14). Por outro lado, a VE tem mostrado capacidade antioxidante estando envolvida na preservação da integridade das membranas contra a ação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (15,16). Devido à presença do grupo hidroxilo (-OH) no anel na posição C6, a VE pode eliminar os ROS de uma forma direta, através da doação do hidrogénio. No entanto, vários estudos também referem que a VE estimula a ação das enzimas antioxidantes endógenos. Ebeid *et al.* (15) verificaram que a adição de 25 mg/kg de VE na dieta de coelhos levou a um aumento da glutathione-peroxidase (GPx) quando comparado com os coelhos que não receberam nenhuma suplementação (15).

Inúmeros estudos sugerem, também, que a suplementação com VE em animais é uma abordagem promissora na melhoria da estabilidade da carne de porco e galinhas durante o armazenamento (12,17). A oxidação lipídica nos tecidos musculares é uma das principais causas da deterioração da qualidade da carne nos animais e Cannon *et al.* (17) verificaram que a suplementação com 100 mg/kg de VE em porcos melhorou a estabilidade da carne durante o armazenamento. Neste trabalho obteve-se uma redução de cerca de 35-40% da oxidação lipídica da mesma. Yuming *et al.* (12) avaliou a taxa de peroxidação lipídica da carne de galinhas durante 6 semanas sendo adicionado à dieta uma suplementação com diversas quantidades de VE (5,10,50 e 100 mg/kg). Os resultados evidenciaram uma diminuição na taxa de peroxidação lipídica em níveis mais elevados de VE (50 e 100 mg/kg), sugerindo que a suplementação com esta vitamina melhora a estabilidade da carne (12). Em ambos os estudos é demonstrado um aumento dos níveis de VE no plasma sugerindo uma maior retenção da mesma nos tecidos musculares. Deste modo, a sensibilidade à oxidação dos tecidos musculares é diminuída devido à capacidade antioxidante da VE.

A vitamina D (VD) é indispensável na absorção de cálcio e fósforo nos animais, podendo ser obtida através da dieta ou por irradiação do corpo (18). As duas formas de VD são o ergocalciferol (VD2) e colecalciferol (VD3), sendo que a D3 é produzida a partir do precursor de 7-desidrocolesterol. A VD3 necessita de ser metabolizada para se tornar biologicamente ativa e assim é hidroxilada a 25-hidroxicolecalciferol no fígado pela ação da enzima 25-hidroxilase, já no rim forma-se a molécula metabolicamente ativa da VD, 1,25-di-hidroxicolecalciferol (1,25VD3), pela ação da 1-hidroxilase (19).

A homeostase de cálcio no organismo é regulada pela 1,25VD3 e a sua ação é iniciada através da sua ligação a recetores da VD (VDR) no núcleo das células-alvo. Esta ligação leva à síntese de RNA que codifica para várias proteínas, como é o caso da calbindina (proteína de ligação de cálcio), estando também envolvida no incremento das bombas de cálcio (Ca^{2+} ATPase) na membrana basolateral do intestino (18,19). Assim a 1,25VD3 aumenta a concentração de cálcio no plasma através do estímulo da sua absorção no trato gastrointestinal. O raquitismo e a discondroplasia tibial (DT) são distúrbios metabólicos geralmente associados à deficiência de VD e são muito frequentes em aves (8,19). Naas *et al.* (8) realizaram um estudo com 300 pintainhos e verificaram que a adição de VD teve um efeito positivo em lesões ósseas destes animais. Após administração de VD observaram que a probabilidade de ocorrer DT nos pintos diminui cerca de 5 vezes quando comparado com o grupo controlo ($p < 0,05$) (8).

Em suma é relevante estabelecer uma relação entre a importância da suplementação com estas vitaminas com a nutrição animal. Estas podem funcionar como adjuvantes em respostas imunes, demonstrando-se essenciais no controlo do poder antioxidante do organismo e consequente controlo de ROS nos animais (10,11,14). Em situação de *stress* ocorre maior produção de ROS e quando a sua eliminação não é eficiente o sistema imune fica comprometido (10).

1.1.2. Vitaminas hidrossolúveis na alimentação animal

As vitaminas hidrossolúveis são indispensáveis para todos os animais e são essenciais na regulação de processos metabólicos. Estas são necessárias como co-fatores em inúmeros ciclos metabólicos como, por exemplo, a gluconeogénese e o ciclo da metilação (2,20). A população microbiana do rúmen é capaz de sintetizar estas vitaminas para manter o equilíbrio basal do organismo, no entanto as exigências nutricionais podem ser superiores. Por exemplo, a produção de leite por vacas leiteiras de alto rendimento, devido às elevadas taxas metabólicas, pode levar a uma necessidade extra de vitaminas hidrossolúveis de modo a manter a homeostase do organismo (2). Estudos recentes têm demonstrado o aumento da produção de leite em vacas leiteiras em resposta a suplementação com estas vitaminas (21,22).

Durante o período de lactação as vacas apresentam um défice de energia e estudos referem que a suplementação com ácido fólico (vitamina B9) e vitamina B12 melhora a eficiência

do metabolismo energético neste período (22,23). Estas duas vitaminas estão envolvidas no ciclo de metilação. Por um lado a vitamina B12 é uma coenzima da metionina sintase, que está envolvida na transferência de um grupo metilo de 5-metiltetra-hidrofolato para homocisteína com consequente regeneração da metionina. Este aminoácido é o precursor de S-adenosilmetionina, o principal dador de grupos metilo. Por outro lado, a vitamina B12 também funciona como coenzima da enzima metilmalonil-CoA mutase que catalisa a passagem de metilmalonil-CoA a succinil-CoA, capaz de incorporar o ciclo de *Krebs*. Durante a lactação são necessárias elevadas quantidades de glucose como fonte de energia, no entanto a quantidade absorvida a partir do amido é limitada e por isso as vacas leiteiras baseiam-se fortemente na gluconeogénese para obter energia (22,23). Esta vitamina é então essencial na produção de energia pelas vacas. Preynat *et al* (22) verificaram que a suplementação com ácido fólico e B12 levou a um incremento de lactose e produção de leite em vacas. Os resultados evidenciaram, também, um aumento de 15% na enzima metilmalonil-CoA mutase com consequente aumento do fluxo de glucose no organismo.

A biotina é também uma vitamina importante na produção de energia nas vacas. O aumento da produção de glucose tem sido demonstrado para explicar os efeitos positivos da suplementação com biotina na produção de leite. Esta vitamina funciona como coenzima da enzima piruvato carboxilase e da propionil-CoA carboxilase, essenciais na produção de glucose (20). Zimmerly *et al* (21) observaram um incremento linear da produção de leite com a suplementação de 0, 10 e 20 mg de biotina. Este incremento foi de 0,9kg/dia e 2,8kg/dia de leite acima do controlo (0 mg), com a suplementação de 10 e 20 mg, respetivamente (21).

A tiamina (vitamina B1) é também essencial no organismo dos animais. A poliencefalomalacia (PEM) é uma doença do sistema nervoso que aparece em ruminantes e que se associa à deficiência de tiamina (24,25). Esta deficiência pode resultar da falta da sua síntese a nível microbiano do organismo, devido à administração de antagonistas como é o caso do enxofre (S) ou devido à produção de tiaminases que degradam a vitamina (25). Nos tecidos dos mamíferos a tiamina está presente na sua forma livre, como monofosfato de tiamina (TMP), pirofosfato de tiamina (TPP) e trifosfato de tiamina (TTP). O S tem sido relatado com um antagonista da tiamina, no entanto o mecanismo exato de inibição não está claro. Em ruminantes com PEM, após administração de S, verifica-se uma diminuição de TPP no entanto ocorre um aumento da tiamina na sua forma livre no cérebro. Assim,

pensa-se que o S interfere na conversão metabólica de tiamina em TPP, interferindo na enzima pirofosfocinase (26). O TPP é um co-fator de inúmeras enzimas do metabolismo energético, como é o caso da pirofosfato desidrogenase (conversão piruvato em acetil-CoA) (25,26). Assim, a suplementação com tiamina também se relaciona com o incremento da produção de leite, relacionando-se com o seu papel no metabolismo energético (24).

A niacina (vitamina B3) e riboflavina (vitamina B2) são também vitaminas essenciais para o bom funcionamento do organismo dos animais. Estas são precursoras de coenzimas essenciais como é o do NAD e FAD, respetivamente, e assim estão associadas a processos de oxidação-redução importantes no organismo (27,28). A suplementação com estas vitaminas está associado a um aumento da produção de leite bem como a um melhoramento da performance das vacas (20,27,28).

A vitamina C (ácido ascórbico) é também uma vitamina hidrossolúvel com elevado poder antioxidante, estando envolvida na eliminação de ROS. Esta vitamina relaciona-se com a diminuição do *stress* oxidativo em animais, sendo relatado que estimula a ação da enzima SOD (13,29). Um estudo demonstrou que em vacas com inflamação aguda mamária induzida a suplementação com ácido ascórbico levou a uma diminuição o processo inflamatório (29). Esta inflamação leva a uma diminuição da produção de leite e 5 horas após a suplementação com ácido verificou-se um incremento da produção de leite de 9% quando comparado com o controlo (não suplementado) (29).

A suplementação com vitaminas hidossolúveis é, desta forma, considerada crucial. Estas são essenciais como co-fatores de inúmeras enzimas envolvidas na produção de energia, por exemplo, essencial na produção de leite. De facto, sabe-se que a produção de leite por vacas leiteiras continua a aumentar e, por isso, as exigências nutricionais dos animais também incrementam. Por outro lado algumas deficiências destas vitaminas podem levar a doenças, como é o caso da PEM (25), podendo também comprometer a defesa antioxidante endógena do organismo (27).

1.1.3. Minerais na alimentação animal

Uma nutrição mineral adequada pode ser utilizada como uma estratégia para otimizar o crescimento, a reprodução e a produção de leite de animais (4,30). A suplementação

mineral é tradicionalmente fornecida através de sais inorgânicos. No entanto, nos últimos anos, têm existido um grande interesse pela utilização dos minerais na forma orgânica, essencialmente quelatados com aminoácidos ou proteínas como forma de suplementação na alimentação animal (31,32). Nesta forma o metal poderá ser protegido e evita-se a formação de complexos com outros componentes da dieta que inibem a sua absorção e estabilidade (32).

Vários estudos referem a importância dos minerais na alimentação de vacas leiteiras (4,33,34). Habitualmente a suplementação é feita com vários minerais em simultâneo. O zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), selénio (Se) e cobalto (Co) são os mais utilizados e Griffiths *et al.* (34) verificou que a suplementação com estes minerais levou a um incremento da produção de leite em vacas leiteiras. Além disso também se tem verificado um incremento de imunoglobulinas no leite, um incremento na taxa de fertilidade e uma diminuição da taxa de morte de bezerros durante o parto em vacas suplementadas com Mn, Zn, Cu e Co (4,35).

O Cu é um co-fator catalítico e estrutural de enzimas essenciais do metabolismo, como é o caso da citocromo c oxidase e a SOD dependente de cobre (32,36). No sistema biológico os iões de Cu aparecem em dois estados de oxidação Cu^+ (reduzido) e Cu^{2+} (oxidado). A sua absorção ocorre essencialmente no intestino delgado através de transportadores específicos, que têm mais afinidade para a forma reduzida. Assim, o Cu^{2+} é reduzido a Cu^+ por ação de uma metaloredutase presente na membrana apical do enterócito (31,36). Vários estudos referem o papel da deficiência de Cu na indução de danos no DNA, através do aumento do *stress* oxidativo (33,37). Abba *et al.* (37) realizaram um estudo com vacas, tendo verificado que a suplementação com Cu estava associada a uma diminuição das aberrações cromossómicas quando comparada com vacas deficientes em Cu. Este facto foi relacionado com o *stress* oxidativo, uma vez que ocorre diminuição da ação da SOD.

A importância do Se é associada, principalmente, ao seu papel como co-fator catalítico da enzima GPx, que fornece uma defesa contra o *stress* oxidativo, catalisando a redução dos peróxidos no organismo. Após a suplementação com este mineral observa-se uma relação linear entre o aumento de GPx no músculo com o aumento de Se na corrente sanguínea (30,33). Vignola *et al.* (38) observaram que os animais que receberam suplementação de Se apresentavam maior atividade da GPx no músculo e consequentemente uma diminuição

da taxa de peroxidação lipídica (38). Esta melhoria da estabilidade da carne foi atribuída ao reforço da capacidade antioxidante do músculo devido à presença de Se.

O Zn é também um co-fator da enzima SOD e por isso é essencial no funcionamento da enzima (30). Além disso tem sido descrita a importância deste mineral na manutenção do sistema imunitário. A mastite é uma inflamação mamária que ocorre em vacas e que leva a uma diminuição da produção de leite e que se relaciona com aumento da contagem de células somáticas (SCC). A deficiência em Zn e Se pode resultar num aumento de SCC e consequentemente elevadas taxas de mastite em vacas leiteiras (33,39). Cope *et al.* (39) verificaram uma correlação positiva entre a suplementação com Zn e Se com a diminuição na SCC ($p < 0,05$). A suplementação com estes minerais na forma orgânica levou a um incremento da produção de leite (39). Outras investigações recentes corroboram com estes resultados onde se verificou uma diminuição de cerca de 4x na SCC e um aumento da produção de leite em vacas suplementadas com Zn orgânico (30). Assim o aumento na SCC em vacas, onde os níveis de Zn são baixos, pode ser atribuído a uma diminuição da função leucocitária, o que resultará num aumento da susceptibilidade da glândula mamária e consequentemente o aparecimento de mastites (39).

A importância da suplementação com minerais é essencial para o metabolismo equilibrado dos animais. Como descrito anteriormente, estes minerais são co-fatores de enzimas antioxidantes essenciais no organismo. Manter os níveis adequados dos antioxidantes é essencial uma vez que os ROS contribuem para a suscetibilidade de doenças. Assim, a suplementação com estes minerais leva uma maior capacidade de resposta imunológica, relacionando-se com o seu mecanismo antioxidante (30).

1.2. Formulações de dispersão de vitaminas em água para alimentação animal

As vitaminas desempenham um papel importante na nutrição humana e animal. A solubilização das vitaminas hidrossolúveis em água é um processo fácil e direto, devido à sua elevada solubilidade. No entanto é muito importante controlar os fatores que afetam a sua estabilidade em ambientes aquosos, discutidos à frente no ponto 1.3. Já no caso das vitaminas lipossolúveis (VL) a sua solubilização é um processo mais complexo. A utilização destas moléculas nos alimentos tem sido elevada, no entanto a sua baixa solubilidade, a elevada sensibilidade à oxidação e a baixa biodisponibilidade são algumas

das limitações da sua aplicação em ambientes aquosos (40). Inúmeros estudos foram desenvolvidos com intuito de aumentar a solubilidade das VL em água (41,42). A formação de emulsões (40,41) e o encapsulamento à base de biopolímeros (42,43) (figura 1) são métodos bastante estudados para o aumento da dispersão das vitaminas lipossolúveis em água. Em ambos os processos as vitaminas encontram-se no núcleo hidrofóbico do agente protetor, sendo que a componente hidrofílica fica em contacto com a água (figura 1).

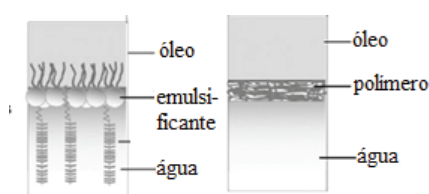


Figura 1- Esquematização de uma emulsão com um agente emulsificante (lado esquerdo) e com um polímero (lado direito). Adaptado de (44)

Além de protegerem as vitaminas do processo de oxidação, estes processos promovem um aumento da solubilidade das mesmas em água (40,42).

1.2.1. Emulsões

Inúmeros sistemas têm vindo a ser desenvolvidos para ultrapassar a baixa solubilidade das VL em água, onde se inclui as emulsões do tipo óleo-em-água (O/W) (40,42). A instabilidade das emulsões é colmatada com o uso de emulsificantes, compostos anfifílicos que são capazes de diminuir a tensão interfacial da gotícula dispersa em água. Estes têm a capacidade de formar micelas, conseguindo proteger os compostos lipofílicos no seu interior, como é o caso das vitaminas (46). As metodologias utilizadas para a obtenção de emulsões incluem metodologias de alta energia e de baixa energia. Tal como o próprio nome indica a grande diferença nestas metodologias está na energia necessária para se obter a emulsão e no caso dos métodos de alta energia normalmente são empregadas a homogeneização com alta pressão ou ultrassons. As metodologias de baixa energia envolvem a formação espontânea de emulsões que consiste na adição de uma das fases (aquosa ou lipídica) à outra que se encontra em agitação constante, sem grandes custos associados (40). Neste tipo de emulsões, o tamanho das gotículas que se formam depende essencialmente do tipo de emulsificantes utilizando, da velocidade e do tempo de agitação (46,47).

Vários estudos têm demonstrado que é possível incorporar as VL em ambiente aquoso, utilizando diferentes emulsificantes e a vitamina E é a mais estudada na literatura (47,48). Segundo Ying Yang *et al.* (48) a utilização de emulsificantes como Q-naturale e tween 80 permite a aplicação da vitamina E em alimentos e bebidas. O Q-naturale é um emulsificante natural obtido através da extração de saponinas da *Quillaja Saponaria* e o tween 80 é um emulsificante sintético (E 433) que provém da reação do sorbitol com o ácido oleico. Neste trabalho, a emulsão foi preparada através da homogeneização a alta velocidade durante 2 min de 10% da fase lipídica com 90% da fase aquosa, sendo que a fase aquosa continha 1% do emulsificante. A adição do emulsificante tween 80 permitiu a formação de gotículas mais pequenas quando comparadas com o emulsificante natural (48). Amir *et al.* (47) também prepararam emulsões contendo a vitamina E utilizando como emulsificante o tween 80. Neste trabalho foi utilizado o método de formação espontânea de emulsões contendo 10% de emulsificante, 10% da vitamina e 80% de fase aquosa. O emulsificante foi misturado com a vitamina e em seguida esta mistura foi lentamente vertida na fase aquosa em agitação com 500 rpm e 25°C. Os resultados demonstraram que o emulsificante tween 80 era capaz de produzir gotículas pequenas com cerca de 150 nm (47). Utilizando também o método de formação espontânea de emulsões, Małgorzata *et al.* (49) observaram a formação de gotículas de 209 nm quando aplicada uma agitação de 150 rpm durante 20 min. Neste caso a emulsão foi preparada através da adição da fase aquosa à fase orgânica em agitação a 25°C (49). Ambos os estudos (47,49) corroboram com resultados mais recentes relativos à formação de gotículas com 79-115 nm quando aplicada uma agitação de 2000 rpm durante 30 min. Neste estudo utilizou-se 4% de emulsificante e a emulsão foi preparada através da adição da fase aquosa à fase lipídica sobre agitação (46). Os resultados evidenciam, então, que a velocidade de agitação é um ponto essencial no controlo do tamanho das partículas formadas.

Existem outros emulsificantes utilizados na preparação de emulsões do tipo óleo-em-água, como por exemplo a lecitina (46), o propileno glicol (49), e cremophor EL (CrEL) (50). O cremophor EL, também conhecido como óleo de rícino polietoxilado, é um emulsificante sintético formado através da reação de óxido de etileno com óleo de rícino (50). A sua aplicação tem sido bastante alargada sendo muito usado como veículo de solubilização de uma ampla variedade de fármacos hidrofóbico. O paclitaxel, conhecido comercialmente

por taxol, é um fármaco que é aplicado no tratamento do cancro e contém 50% de cremofor EL na sua composição (51).

1.2.2. Encapsulamento à base de biopolímeros

Os compostos sensíveis à degradação/oxidação podem ser encapsulados em biopolímeros que funcionam como barreiras físicas contras os agentes que podem promover a oxidação destas moléculas (52,53). No caso das vitaminas lipossolúveis (VL) podem ser encapsuladas com biopolímero e este processo baseia-se na estrutura anfifílica do polímero, capaz de formar estruturas capazes de proteger a vitamina (53). As VL têm sido encapsuladas através de processos físico-químicos como é o caso da coacervação, *spray drying* e extrusão (44,54).

A técnica de secagem por atomização (*spray drying*) envolve a homogeneização das vitaminas e do biopolímero num solvente orgânico. A secagem da emulsão ocorre através da passagem de um fluxo de ar quente, obtendo-se um amostra em pó (54). Este método tem vindo a ser aplicado tanto à vitamina C utilizando a quitosana reticulada com o tripolifostato com agente encapsulante, e ao β -caroteno onde a dextrose é o agente encapsulante (45,55). Utilizando este método obtém-se estruturas esféricas que protegem as moléculas, melhorando a sua aplicação na indústria alimentar (55). No conceito da encapsulação por coacervação normalmente são utilizados polímeros solúveis em água. (44). A adição de um eletrólito promove a diminuição da solubilidade do polímero levando à formação de agregados. Estes agregados vão depositar-se na fase hidrofóbica dispersa formando um filme protetor. Este processo foi aplicado à vitamina A, obtendo-se uma eficiência de encapsulação de 63% (56). O método de extrusão consiste em empurrar um material fundido através de uma matriz, obtendo-se o material encapsulado (57). Normalmente a matriz utilizada é formada por carboidratos e são utilizadas temperaturas na ordem dos 70-150°C que podem não preservar a integridade das vitaminas. Este método foi anteriormente aplicado à vitamina D e dependendo do tipo de carboidrato utilizando a percentagem de encapsulação varia entre os 66 e 99% (57).

No processo de encapsulação, os polímeros mais estudados são as ciclo e maltodextrinas (58,59) e a goma acácia (GA) (43). Estes polímeros são compostos anfifílicos, podendo formar estruturas moleculares como micelas. A goma acácia é um exsudato extraído das

folhas e caules de árvores do género *Acacia*, essencialmente da *Acacia Senegal*. A GA têm várias aplicações a nível industrial principalmente na indústria alimentar funcionando como emulsificante e estabilizador. Os polissacarídeos da GA apresentam uma estrutura bastante ramificada, sendo que a cadeia principal é composta por resíduos de L-galactose em ligação 1→3 com cadeias laterais ligadas à cadeia principal essencialmente por ligações 1→6. Os resíduos de L-arabinose, L-ramnose, ácido glucurónico e ácido 4-O-metilglucurónico estão presentes nas cadeias laterais sendo que estes dois últimos normalmente estão localizados nas extremidades (60,61). Estes complexos aumentam a solubilidade das VL e consequentemente estão envolvidos no melhoramento da biodisponibilidade das mesmas (43,44). As propriedades de emulsificação da GA são atribuídos essencialmente à presença da fração de proteína (61). Um estudo mais antigo realizado por Randall *et al.* (62) mostrou que a parte hidrofóbica da cadeia polipeptídica estava preferencialmente adsorvida na interface óleo-água enquanto que os blocos hidrofílicos dos polissacarídeos e da proteína projetavam-se para a solução aquosa funcionando como uma forte barreira contra a agregação e coalescência das gotículas. O tratamento da GA com uma protease levou à perda da atividade emulsificante e assim concluiu-se que a proteína é um componente chave no processo de emulsificação. A utilização destas gomas tem vindo implementado às vitaminas lipossolúveis, essencialmente à vitamina A (43). O ácido retinóico (RA) tem também sido alvo de vários estudos no processo de encapsulação com ciclodextrinas (58,59). Montassier *et al.* (59) investigaram o processo de encapsulação utilizando as α -ciclodextrinas, hidroxipropil- α -ciclodextrina e dimetil- α -ciclodextrina, verificando que em todos os casos ocorreu um aumento bastante significativo da solubilidade do ácido em água. No entanto estes mesmos autores verificaram que as partículas formadas não eram estáveis uma vez que passados cerca de 15 min ocorreu precipitação do RA. No entanto estudo mais recente realizado por Lin *et al.* (58) demonstraram maior estabilidade do RA encapsulado com 2-hidroxipropil- α -ciclodextrina. Neste mesmo trabalho também se verificou um aumento da solubilidade do RA de cerca de 35000 vezes. Olhando para as discrepâncias acima mencionadas relativamente à estabilidade podemos ter em conta o método de preparação utilizado. No trabalho de Montassier *et al.* (59) o RA é dissolvido em etanol enquanto que na experiência de H. S. Lin *et al.* (58) o ácido é dissolvido diretamente em água. A utilização do etanol aumenta a própria solubilidade do RA em água e consequentemente no processo de

encapsulação com as ciclodextrinas podem estar envolvidas várias moléculas de RA levando a complexos menos estáveis.

Em suma, tanto a criação de emulsões como o encapsulamento são benéficos relativamente ao aumento da solubilidade das vitaminas. No entanto é importante ter em conta alguns entraves de cada método, por exemplo no encapsulamento pela técnica de *spray drying* é utilizado um solvente orgânico e por isso é importante garantir que todo o solvente é eliminado. Já o método de extrusão envolve a utilização de temperaturas muito elevadas, o que pode levar à destruição das vitaminas. As emulsões, por sua vez, são métodos muito dependentes do emulsificante utilizado assim como da velocidade e do tempo de agitação. Estas são também mais sensíveis a fatores externos uma vez que estão menos protegidas quando comparadas com o encapsulamento com biopolímeros.

1.3. Estabilidade de vitaminas em suplementos

As vitaminas têm diferentes graus de sensibilidade a fatores externos como a luz, calor, pH, tempo de armazenamento e presença de oxigénio. A estabilidade física e química na preparação das emulsões das vitaminas lipossolúveis são os processos importantes no controlo da atividade destas vitaminas (63,64). A estabilidade química é o fator mais importante no controlo da atividade das vitaminas. A exposição ao ar e luz está associada à diminuição da atividade destas vitaminas (65,66). Além disso, quando expostas a agentes oxidantes, como os minerais inorgânicos, a taxa de destruição também aumenta (67).

1.3.1. Estabilidade das vitaminas lipossolúveis

Existem vários mecanismos físico-químicos que podem influenciar a estabilidade das emulsões ao longo do tempo. A separação gravitacional é a forma mais comum de instabilidade nas emulsões e pode aparecer na forma de sedimentação inferior ou superior, dependendo da densidade da fase contínua e da fase dispersa (63). No caso das vitaminas lipossolúveis, como apresentam densidade inferior à da água, o que se pode verificar é sedimentação a nível superior. Este processo é contrariado pelo movimento Browniano das partículas e este é tanto maior quanto menor o tamanho das partículas (46,63).

A degradação química das vitaminas é o principal fator de instabilidade sendo os fatores como a luz, oxigénio e pH os mais importantes. Allwood *et al.* (68) investigaram o efeito da exposição à luz e oxigénio da vitamina A e E. Esta presença de luz levou à perda de

ambas as vitaminas no entanto verificou que na ausência de oxigênio a exposição à luz não levou a uma perda significativa da vitamina E (68). Na presença de O₂ a vitamina E pode sofrer oxidação, resultando na formação do radical tocoferoxilo, tal como se observa na figura 2.

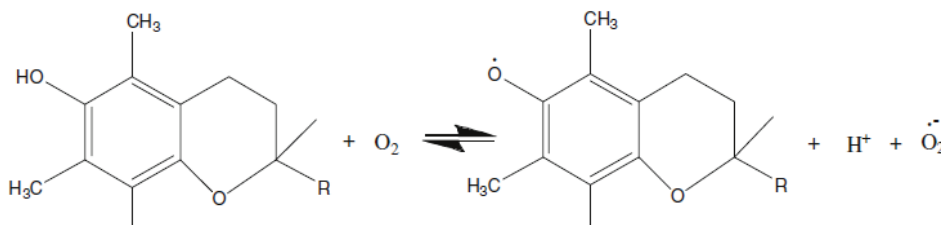


Figura 2- Oxidação da vitamina E na presença de O₂. Adaptado de (69).

Por sua vez, este radical na presença de luz pode levar à quebra da vitamina levando à formação de quinonas (figura 10).

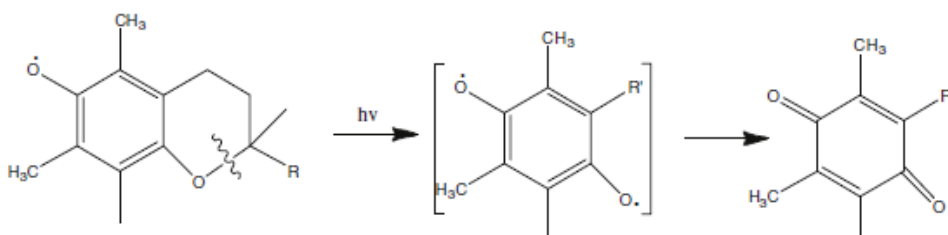


Figura 3- Destruição da vitamina E na presença de luz, com formação de uma quinona. Adaptado de (69).

A vitamina A é também sensível à presença de luz e oxigênio. Um estudo observou perdas de 23-36% e 0-17% de vitamina A e D, respectivamente, quando armazenadas durante um mês no escuro. Quando expostas à luz, as perdas aumentaram em ambos os casos para 60-68% (70). Na presença de luz e O₂ a vitamina A é facilmente oxidada, podendo ocorrer a clivagem das duplas ligações da cadeia lateral levando à formação de produtos de fotodecomposição da vitamina A, como é o caso das α -iononas (71).

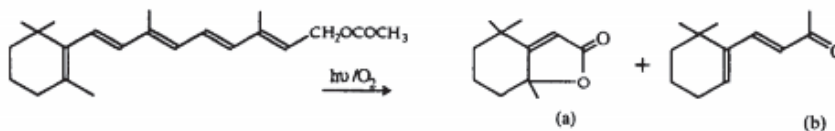


Figura 4- Via de oxidação da vitamina A palmitato na presença de luz e O₂, levando à formação de (a)- α -ionona e (b)- 2-hidroxi-2,6,6-trimetilciclohexanona. Adaptado de (71).

Este processo por sua vez é acelerado na presença de ROS. Um estudo realizado por Puysuwan *et al.* (72) avaliou a degradação da vitamina A na presença de luz e O₂. Quando

o armazenamento foi feito à luz solar sem contacto com o O₂ a percentagem de perda vitamina foi de 27,1 % enquanto que a exposição adicional ao O₂ levou a um aumento da perda da vitamina 88,6%. Quando as amostras foram armazenadas ao escuro e na presença de O₂ a retenção da vitamina foi de 97,4% (72). Este estudo refere então que a presença de luz solar é mais crítica quando comparada com a presença de oxigénio.

A vitamina D3 é também sensível à presença de luz podendo sofrer processos de fotociclicização formando o lumisterol ou pode sofrer uma isomerização com consequente formação de epóxidos, na presença de ROS (73,74). King *et al.* (74) observaram uma perda da vitamina D em 53% em 24h quando exposta a ROS, neste caso o oxigénio singuleto. Neste trabalho foi verificada a formação de epóxidos, levando à degradação da vitamina.

A encapsulação tem sido muito estudada, tendo sempre como objetivo a melhoria da estabilidade oxidativa dos compostos. O encapsulamento de óleos tem sido descrita como vantajosa, estando associada à diminuição oxidação do mesmo (75,76). A combinação de maltodextrinas (MD) e goma acácia (GA), tem sido muito aplicada no processo de encapsulação de compostos lipofílicos, estando relacionado com uma maior estabilidade dos compostos encapsulados (75,77). Bule *et al.* (77) observaram um melhoramento da estabilidade da ubiquinona-10 quando encapsulada. Este trabalho foi realizado ao longo de 6 semanas e observaram que a GA foi o agente encapsulante que ofereceu maior estabilidade oxidativa mesmo após a incidência de luz UV (77). Carneiro *et al.* (76) realizaram um estudo onde avaliaram a eficiência de encapsulação de compostos lipofílicos com diferentes materiais. A utilização da mistura de MD e GA apresentou um menor tamanho das partículas formadas, já a mistura de MD com proteínas levou à formação de gotículas com tamanho superior. Por sua vez, esta junção de MD e GA demonstrou uma maior resistência do movimento das gotas evitando assim o processo de coalescência. No que toca à estabilidade oxidativa a mistura de GA com MD apresentou uma menor taxa de oxidação quando comparada com MD e proteínas. Este facto está relacionado com a ramificada estrutura da GA, que devido às suas características leva à formação de partículas com uma porosidade menor e consequentemente reduz a permeabilidade de agentes externos como o O₂ e luz (76,77). Assim, a junção de GA e MD como agentes encapsulantes têm-se demonstrado benéfica em relação à melhoria da

estabilidade dos compostos encapsulados, funcionando como protetores contra agentes externos.

Em suma, as vitaminas lipossolúveis são sensíveis a fatores como o oxigênio e a luz, tal como já foi referido. Por isso é importante controlar e evitar que estes estejam em contacto com as mesmas. O processo de encapsulação parece ser muito vantajoso em relação a estabilidade oxidativa de compostos lipofílicos. Em óleos este processo está associado a uma diminuição da oxidação e assim a encapsulação das vitaminas poderia ser uma mais valia na sua estabilidade.

1.3.2. Estabilidade de vitaminas hidrossolúveis

As vitaminas hidrossolúveis são bastante sensíveis a fatores como a luz, oxigênio e pH. A vitamina C (ácido ascórbico) é a mais sensível quando em soluções aquosas. O mecanismo de degradação consiste na oxidação da mesma, sendo que a primeira fase da reação é a formação do ácido desidroascórbico (DHA) conhecido como biologicamente ativo (65,78). A hidrólise deste ácido leva à produção de ácido 2,3-dicetogulónico, biologicamente inativo, tal como se observa na figura 5.

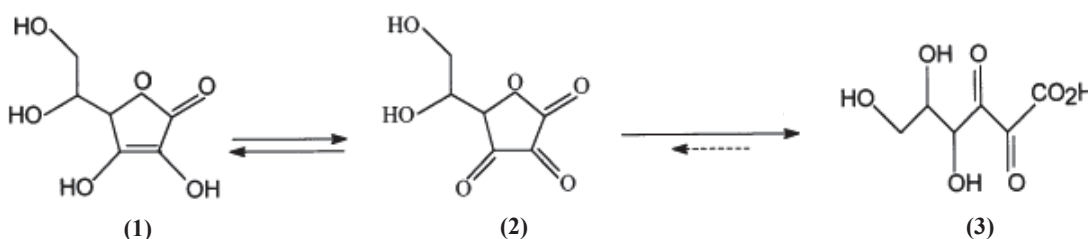


Figura 5- Via de degradação do ácido ascórbico em solução aquosa. (1)- ácido ascórbico; (2)- ácido desidroascórbico; (3)- ácido 2,3-dicetogulónico Adaptado de (79).

A velocidade da reação, além de regulada pela presença de oxigênio, também é acelerada na presença de iões de cobre, ferro entre outros (65,80). Na presença de água ocorre formação de ascorbato (AscH^-), forma ionizada do ácido ascórbico, que pode reagir com o Fe^{3+} , levando à produção de DHA e posteriormente de oxigênio singuleto ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (figura 2). (80).

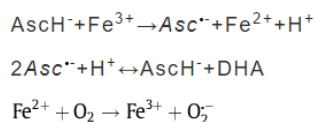


Figura 6-Via de oxidação do ácido ascórbico catalisada pelo ferro (Fe^{3+}) com consequente produção de ROS. Adaptado de (81)

Além disso, a oxidação ácido ascórbico leva à formação de ácido treónico e oxálico, que pode alterar a estabilidade da mistura uma vez que faz diminuir o pH.

A tiamina (B1) é também uma vitamina sensível a fatores externos que podem levar à sua degradação. O sulfito têm demonstrado efeitos prejudiciais na estabilidade desta vitamina, estando envolvido numa reação de redução que leva à clivagem da vitamina (78). A tiamina é estável em soluções de pH 5,5 e instável a pH de 7. É também uma vitamina sensível à luz e Chen *et al.* (66) observaram uma perda de 26% de tiamina em misturas depois de 8 h de exposição à luz solar.

A riboflavina é uma vitamina bastante sensível à luz e oxigénio podendo ser irreversivelmente degradada a luminoflavina e luminicromo (78). Estudos descrevem a perda de 47% desta vitamina quando exposta à luz solar durante 8h (66). Esta vitamina é descrita como aceleradora da fotodegradação de outras vitaminas do complexo B, como é o caso do ácido fólico e da vitamina B12 (81,82). Na presença de luz a riboflavina fica no estado tripleto podendo reagir diretamente com outros componentes da mistura levando á produção de ROS (figura 7) A produção de ROS podem, por sua vez, levar à oxidação de outros componentes da mistura (65,81).

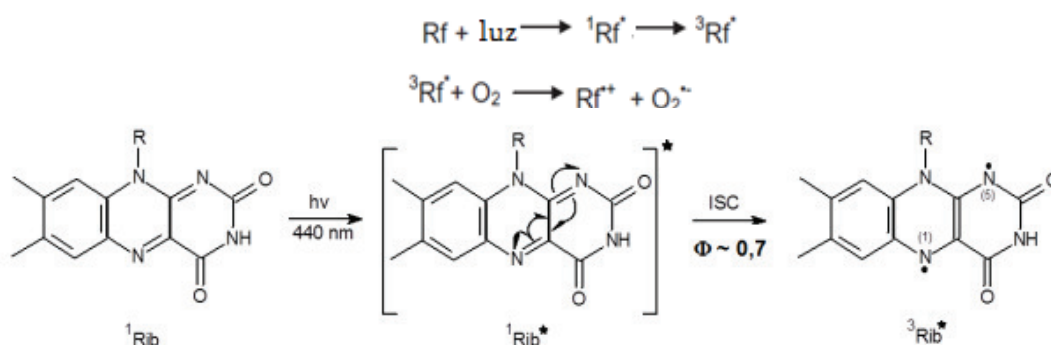


Figura 7- Reação de fotodegradação da riboflavina (Rf) na presença da luz e oxigénio (O_2) com formação de oxigénio singlete (imagem superior). Formação da riboflavina no estado tripleto (imagem inferior) . Adaptado de (65)

Ahmad *et al.* (81) verificaram que a riboflavina afeta a estabilidade da vitamina B12, funcionando como sensibilizador da luz. Neste mesmo estudo também observaram que a

pH entre 7 e 8 a vitamina B12 demonstrou-se mais estável (81). Vários estudos mostram que em solução aquosa a degradação da vitamina B12 resulta principalmente na hidroxilação do cobalto, formando a hidroxocobalamina (81,83).

A estabilidade do ácido fólico em soluções aquosas tem sido estudada e sabe-se que esta vitamina a pH entre 8 e 11 se mantém em solução sendo que em pH inferior pode ocorrer precipitação do mesmo (78,82). Alguns estudos também demonstram que o ácido fólico é relativamente estável em misturas quando armazenado a 4°C e protegido da luz (66,84). Esta vitamina é descrita como sendo instável à presença de luz e O₂ (85–87). Esta apresenta uma estrutura química dividida em 3 frações: 6-metil pterina (A), ácido α -aminobenzoico (B) e um resíduo de ácido glutâmico (C), tal como se pode observar na figura 8.

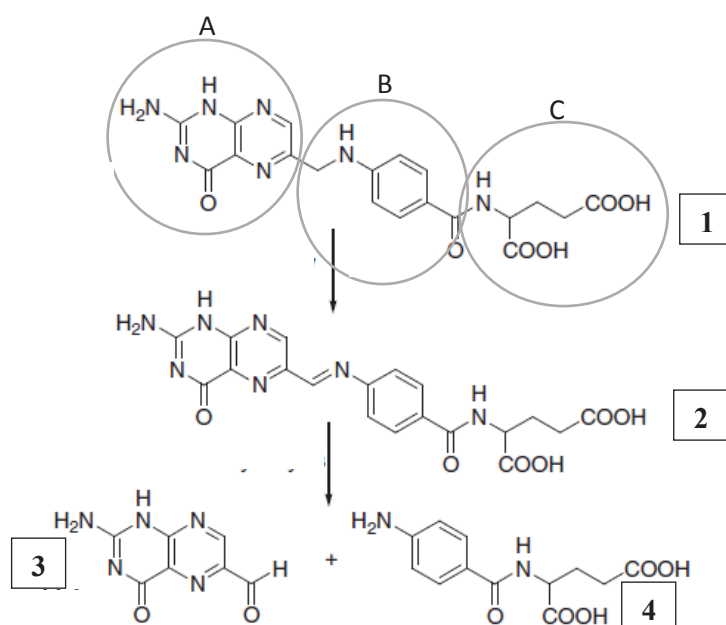


Figura 8-Esquema da via de degradação do ácido fólico na presença de luz e oxigênio em meio ácido. 1- ácido fólico; 2- formação da enamina; 3- 6-formilpterina; 4- ácido α -aminobenzoil-L-glutâmico; Adaptado de (86)

A sua fotodegradação é descrita como sendo mais elevada em meio ácido quando comparada com o meio básico. Esta maior rapidez deve-se à formação da enamina (2), o intermediário formado durante a fotólise (87). Este intermediário, na presença de oxigênio é facilmente hidrolisado a 6-formilpterina (3) e ácido α -aminobenzoil-L-glutâmico (4) (86,87).

Perante isto é então muito importante controlar os fatores que afetam a estabilidade das vitaminas em soluções aquosas. O controlo da incidência de luz é um fator fundamental

uma vez que muitas vitaminas sofrem fotodegradação. A quantidade de oxigênio é também um ponto essencial que deve ser monitorizado, evitando a degradação e formação de ROS. A adição de antioxidantes a estas misturas é fulcral no controlo dos ROS, evitando que estes levem à oxidação de outros componentes da mistura.

Por outro lado, a presença de agentes oxidantes, como os minerais, pode acelerar a destruição das vitaminas. Investigações antigas referem que a presença de minerais inorgânicos em suplementos multivitamínicos levam a um incremento na perda de atividade das vitaminas quando comprado com suplementos não contendo minerais (67,88). A utilização de fontes minerais quelatados, na forma orgânica, têm a capacidade de proteger as vitaminas de cargas iónicas que estão associadas aos minerais inorgânicos (88). Shurson *et al.* (67) verificaram uma diminuição da perda de atividade das vitaminas de 40-50% quando utilizados minerais complexados com aminoácidos quando comparado com os minerais inorgânicos, durante um tempo de armazenamento de 120 dias (67). Assim, a utilização de minerais na forma orgânica em suplementos pode melhorar o prazo de validade do produto.

1.4. Funcionamento do HPLC

O equipamento de HPLC apresenta vários componentes, tais como, reservatórios para a fase móvel, bomba, injetor, coluna de separação, onde se encontra a fase estacionária, um detetor e um sistema de aquisição de dados. Num procedimento usual, a amostra é injetada através do injetor automático e arrastada pela fase móvel que se encontra sob pressão, através da coluna que contém a fase estacionária. Os componentes da amostra são separados através de interações com a fase móvel e com a fase estacionária. Estes analitos, ao saírem da coluna, passam por um detetor que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de analito que está a passar na célula do detetor. O equipamento encontra-se ligado a um computador onde se registam e processam os dados necessários de forma a gerar o cromatograma, o qual é utilizado para identificar e quantificar os componentes da mistura. Cada constituinte tem um tempo de retenção característico, que permite a sua análise qualitativa. A análise quantitativa é realizada comparando a resposta do analito presente na mistura com a resposta (área do pico) de soluções padrão cuja concentração é exatamente conhecida (89).

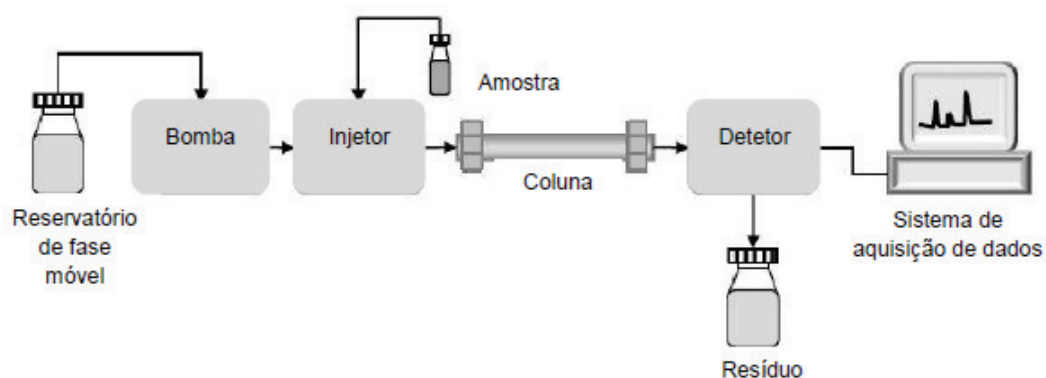


Figura 9- Esquema dos vários componentes de um cromatografo de HPLC. Adaptado de (89)

Atualmente é utilizado com mais frequência HPLC em fase reversa. Neste caso a fase móvel é polar e neste caso são utilizados com mais frequência o acetonitrilo e o metanol, e a fase estacionária é apolar sendo por isso os compostos menos polares, os mais retidos na coluna. A coluna mais utilizada é a C18 (octadecil – sílica) em que a matriz de suporte, a sílica, encontra-se ligada a um n-alceno com 18 átomos de carbono. A retenção em fase reversa é baseada na interação da parte hidrofóbica do analito e as zonas hidrofóbicas da fase estacionária (89,90).

Este método será utilizado na quantificação das vitaminas ao longo deste trabalho.

Capítulo 2 - Enquadramento do trabalho

O trabalho apresentado neste relatório de estágio foi desenvolvido na DIN, SA, sediada em Santa Comba Dão – Viseu, tendo sido parcialmente completado no departamento de Química da Universidade de Aveiro.

A DIN, SA desenvolve e produz a sua própria gama de pré-misturas, alimentos de iniciação e especialidades para vários animais e mantém uma atividade importante na comercialização de matérias-primas. Atualmente a empresa pertence ao grupo CCPA, um grupo francês especializado em nutrição e saúde animal. É um grupo que está em constante mudança para se adaptar e antecipar as necessidades das indústrias de animais. Tem como principais desafios o avanço do conhecimento e da inovação para melhorar a competitividade dos agricultores, qualidade nutricional e sanitária de produtos de origem animal. No âmbito do fabrico de alimentos para animais, a DIN concluiu a implementação do Sistema de Gestão da Segurança Alimentar de acordo com os requisitos da Norma NP EN ISO 22000:2005 no primeiro semestre de 2012. Em Maio de 2014, o Instituto Português de Acreditação (IPAC) concedeu a acreditação ao laboratório de investigação e desenvolvimento (L.I.D) da DIN,SA. Assim a atividade da empresa insere-se no setor do fabrico de alimentos sólidos para animais, desenvolvido nas suas instalações. Já a atividade de desenvolvimentos e inovação de produtos é suportada pelo seu laboratório – L.I.D.

Inovar e crescer é um ponto fulcral da empresa. A aquisição de um misturador de líquidos torna possível alargar a produção, querendo apostar no desenvolvimento e comercialização de suplementos líquidos para animais. E assim o objetivo deste trabalho é desenvolver 2 suplementos líquidos para alimentação animal, constituídos por minerais e vitaminas. Um com vitaminas hidrossolúveis e minerais para ruminantes e outro com vitaminas lipossolúveis para aves e suínos. Pretende-se adquirir um método adequado para a dispersão das vitaminas em água e avaliar a sua estabilidade físico-química. É também importante averiguar qual a metodologia mais adequada na produção destes suplementos de modo a que não haja perda destes compostos durante o período de armazenamento. Encontrar os fatores que mais afetam a perda de atividade das vitaminas e controlá-los será também um grande objetivo deste trabalho. É também um objetivo a caracterização química do material usado na encapsulação das vitaminas lipossolúveis com intuito de perceber qual a sua composição e consequentemente a influencia na estabilidade.

Capítulo 3 - Material e métodos

3.1. Preparação dos produtos líquidos

Os produtos líquidos para análise neste trabalho foram produzidos no laboratório. Para avaliar a eficácia de dissolução/dispersão do misturador de líquidos da empresa foi realizado um teste onde se preparou um dos produtos na própria máquina. Neste processo foram identificados os pontos críticos do misturador e este foi encaminhado para a fábrica para resolução de problemas.

No laboratório os produtos foram preparados em balões aferidos de $500 \pm 0,1$ mL e os produtos foram pesados em balanças de precisão $\pm 0,0001$ g. Nos produtos constituídos por minerais e vitaminas, a dissolução dos minerais realizou-se em primeiro lugar e posteriormente foram adicionadas as vitaminas. No caso das vitaminas hidrossolúveis foram utilizadas amostras da própria fábrica e amostras adquiridas de um fornecedor. Nas amostras adquiridas as fichas técnicas referiam que estes produtos eram indicados para o uso líquido. No caso das vitaminas lipossolúveis A e D, que foram adquiridas, era referido que estavam encapsuladas em polissacarídeos e que estavam preparadas para dissolução em água. Como não era conhecido o tipo de polissacarídeos foram analisados o tipo de açúcares presente por GC-FID e o tipo de ligações glicosídicas por GC-MS. Foi também realizado testes por FTIR. Os produtos líquidos produzidos foram depois colocados em frascos de 125 mL de plástico âmbar e foram bem fechados em ambiente de azoto com tampa de plástico para posterior análise química. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente.

O teor de proteína nas amostras foi determinado recorrendo à análise elementar por combustão – DCT (detetor de condutividade térmica – Truspec 630-200-200). Para determinação do teor de proteína foi considerado o fator de Kjeldahl de 6,25 na multiplicação do teor de azoto obtido na análise elementar.

3.2. Análise de açúcares neutros (GC-FID)

Esta análise iniciou-se com uma hidrólise ácida, posteriormente procedeu-se à redução e acetilação, formando acetatos de alditol que foram analisados em GC-FID.

3.2.1. Hidrólise

A hidrólise realizou-se em tubos de cultura contendo 1-2 mg de amostra. A estes foi adicionado 200 μ L de H_2SO_4 72% e deixou-se a reagir durante 3 h à temperatura ambiente. Os tubos sofreram agitação esporádica com intuito de homogeneizar a solução. Posteriormente adicionaram-se 2,2 mL de água destilada para a concentração de H_2SO_4 atingisse 1M e os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 100°C, durante 2,5h.

3.2.2. Redução e acetilação

Após término da hidrólise os tubos foram arrefecidos num banho de gelo. Adicionou-se, então, 200 μ L de 2-desoxiglucose 1 mg/mL como padrão interno. De seguida transferiu-se 1 mL de solução para novos tubos de cultura e o ácido foi neutralizado com a adição de 200 μ L de NH_3 a 25%. Seguidamente procedeu-se à redução pela adição de 100 μ L de solução de NaBH_4 15% (m/v) em NH_3 3 M (preparada na hora). Após agitação a solução foi colocada durante 1h num bloco de aquecimento a 30°C.

Já com a redução completa, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo e consequentemente adicionou-se 2 vezes 50 μ L de ácido acético glacial com intuito de eliminar o excesso de BH_4^- . Posteriormente foram transferidos 300 μ L de solução para tubos de sovirel e colocaram-se num banho de gelo. A cada tubo adicionou-se 1-metilimidazol, que funciona como catalisador, e 3 mL de ácido acético, reagente que promove a acetilação. Após agitação vigorosa os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 30°C durante 30 min.

Com intuito de recuperar os acetatos de alditol procedeu-se à extração líquido-líquido adicionando 3 mL de água destilada, para remover o excesso de anidrido acético, e 2,5 mL de diclorometano, para extrair os acetatos de alditol. Procedeu-se, então, à agitação manual vigorosa e de seguida os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante cerca de 30 s. A fase aquosa (superior) foi removida por sucção e à fase orgânica adicionaram-se novamente 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano. Segue-se um processo de lavagem com 3 mL de água, repetindo-se 3 vezes, com agitação manual vigorosa antes de cada centrifugação e posterior sucção da fase aquosa. Quando se realizou a última lavagem, toda a fase aquosa foi removida por completo e a fase orgânica foi transferida para tubos de *speedvac*. Estes foram colocados num evaporador centrífugo até à secura.

Seguidamente foram lavadas 2 vezes com 1 mL de acetona anidra e levadas à secura num evaporador centrífugo.

3.2.3. Análise por GC-FID

Para a análise por GC-FID, os acetatos de alditol foram diluídos em 50 μ L de acetona anidra. A coluna capilar usada foi a DB-225 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 μ m de espessura. A fase estacionária utilizada é composta por 50% de cianopropilofenilo e 50% de metil polisiloxano. O cromatógrafo utilizado foi o Perkin Elmer-Clarus 400. O volume de injeção foi de 2 μ L a temperatura do injetor de 220 °C e do detetor a 230 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio e usou-se uma atenuação de 6 e *split* de 10 min. O programa de temperatura foi o seguinte: temperatura inicial de 200 °C com rampa de 40°C/min até aos 220°C, durante 7 min, aplicou-se uma nova rampa de 20 °C/ min até 230°C, durante 1 min.

3.3. Análise das ligações glicosídicas (GC-MS)

De modo a perceber quais os tipos de ligações entre os polissacarídeos foi realizada uma análise de açúcares por metilação. Este método baseia-se na metilação dos grupos hidroxilos que estão livres com posterior acetilação dos grupos que estão envolvidos na ligação. Assim sendo obtemos acetatos de alditol parcialmente metilados que posteriormente serão analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com analisador quadrupolo (GC-QMS).

3.3.1. Reação de metilação

Pesa-se 1-2 mg de amostra para tubos *speedvacc* e procede-se à secagem em estufa de vazio durante 2 h na presença de P₂O₅. De seguida adiciona-se 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) deixando a reação decorrer sobre agitação durante toda a noite, à temperatura ambiente. Consequentemente adiciona-se 40 mg de NaOH em pó, triturado antes da utilização sob atmosfera de árgon, deixando em agitação durante 30 min também à temperatura ambiente. Com ajuda de uma seringa foram adicionados 80 μ L de CH₃I deixando 20 min a reagir com agitação vigorosa. Passados os 20 min repetiu-se a adição de

CH₃I. Por conseguinte foi adicionado 3 mL de uma solução 1:1 em volume de clorofórmio/metanol. As amostras foram dialisadas utilizando membranas com poros 12-14 kDa contra uma solução 1:1 em volume de etanol/água. Foram feitas 2 mudas da solução de diálise e as amostras foram recolhidas para tubos *speedvacc* e levadas à secura no evaporador centrífugo. Para garantir a eficiência da metilação foi adicionado, novamente, 1 mL de DMSO durante o tempo necessário para dissolver toda a amostra, cerca de 30 min. Realizaram-se todos os passos descritos anteriormente até à secura no evaporador centrífugo.

De seguida efetuou-se uma hidrólise às amostras remetiladas. Adicionou-se, então, 500 μ L de TFA 2M e os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 121°C durante 1h, com agitação esporádica. O ácido foi evaporado no evaporador centrífugo.

3.3.2. Hidrólise, redução e acetilação

Posteriormente procedeu-se à redução das amostras que anteriormente tinham sido hidrolisadas. Para isso adicionou-se 20 mg de NaBD₄ e 300 μ L de NH₃ 2M, agitou-se os tubos e foram colocados a reagir a 30°C durante 1h. De seguida arrefeceram-se os tubos em gelo e adicionou-se 2x50 μ L de ácido acético glacial para neutralizar o excesso de NaBD₄.

O processo de acetilação utilizado é igual ao descrito para a análise dos açúcares neutros, explicada anteriormente.

3.3.3. Análise por GC-QMS

Os acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) foram analisados por GC-MS. As amostras foram dissolvidas em 50 μ L de acetona anidra. Utilizou-se um cromatógrafo Agilent Technologies 6890N Network com uma coluna capilar DB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 μ m espessura).

As condições utilizadas foram: volume de injeção 0,2 μ L e a temperatura do injetor foi de 220°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio. O programa de temperaturas utilizado: tempo total de 40 min, temperatura inicial de 50°C, rampa de 8°C/min até 140°C durante 5 min,

uma segunda rampa de 0,5°C/min até 150°C durante 1 min e uma terceira rampa de 40°C/min até 280°C durante 1 min.

3.4. Análise das vitaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O procedimento para a determinação das vitaminas hidrossolúveis (B1, B2, B3, B6 e B9) nos suplementos foi feito segundo um método desenvolvido pela Dionex (90). Este método baseia-se na determinação das vitaminas usando HPLC-DAD (detetor *diode array*). O método usado encaixa-se na cromatografia de fase reversa, onde a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar, sendo por isso os compostos menos polares, os mais retidos na coluna. Inicialmente foram então preparadas as soluções mãe dos padrões de cada vitamina (B3, B6, e B1), onde se pesou cerca de 10 mg da vitamina para balão de 100 mL com intuito de obter concentrações de cerca de 100 ppm. Nas vitaminas B2 e B9 foram pesadas menores quantidade, cerca de 5 mg para balões de 100 mL sendo as concentrações obtidas de 50 ppm. Foram então dissolvidas em água e completou-se o volume até à marca. Sendo os suplementos líquidos, a sua preparação passou apenas por fazer as diluições necessárias. O HPLC utilizado é da marca Hitachi e a coluna usada foi uma C18 (comprimento de 25mm/tamanho do poro 5µm). A temperatura do forno usada foi de 25°C, o volume de injeção de 20 µL e o fluxo foi de 1,0mL/min. A fase móvel A foi acetonitrilo e a B tampão fosfato com concentração de 25 mM e um pH ajustado a 3.2. Na fase móvel foi utilizado o gradiente, apresentado na tabela 1.

Tabela 1- Gradiente de eluição utilizado na separação das vitaminas hidrossolúveis. Adaptado de (90).

TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	A (%) – ACETONITRILO	B (%) – TAMPÃO FOSFATO 25 mM PH 3.2
0	0	100
4	0	100
14	35	65
14,5	80	20
19	80	20
19,5	0	100
20	0	100

A detecção das vitaminas foi feita a diferentes comprimentos de onda, B6 e B3: 210 nm, B1:245nm, B2: 265 nm e B9 a 280 nm. No sentido de identificar os “picos” representados nos cromatogramas, foi necessário injetar padrões das vitaminas de forma a obter os espectros característicos e o tempo de retenção para cada vitamina em estudo. O tempo de retenção de cada vitamina depende do modo da sua interação com a fase estacionária. Assim passou-se primeiramente os padrões e posteriormente fez-se a quantificação das vitaminas nos suplementos.

O procedimento utilizado para a determinação das vitaminas lipossolúveis (A, D3 e E) foi um método interno utilizado na empresa. Assim, foi pesado cerca de 10mg de cada padrão para um balão de 25mL e posteriormente dissolvido em metanol. Com intuito de ajudar na dissolução das vitaminas, estas foram colocadas num banho de ultrassons. A amostra a analisar foi também colocada no banho de ultrassons, após a diluição em água. O HPLC utilizado é da marca Hitachi e a coluna usada foi uma C18 (comprimento de 25mm/tamanho do poro 5µm). A temperatura do forno usada foi de 30°C, o volume de injeção de 20 µL e o fluxo foi de 1,0mL/min. O tempo de corrida utilizado foi de 20 min e a fase móvel utilizada foi uma mistura de 98%:2% metanol/água. A detecção das vitaminas foi feita a diferentes comprimentos de onda, vitamina A-325nm, vitamina D3- 265nm e vitamina E-290nm.

Foram analisadas 2 réplicas de cada amostra. Os resultados estatísticos foram calculados usando ANOVA- fator único.

Capítulo 4 - Resultados e discussão

4.1. Vitaminas lipossolúveis

A encapsulação de moléculas ativas tem como objetivo proteger o material do núcleo através da redução da sua reatividade com o ambiente exterior, como é o caso da luz e oxigénio. É também muito utilizado com intuito de alterar as características físicas do material original, por exemplo no envolvimento de compostos lipossolúveis com materiais hidrossolúveis facilitando o seu manuseamento. Este processo é amplamente utilizado na indústria alimentar onde as moléculas ativas são muitas vezes compostos lipossolúveis, como é o caso das vitaminas. O intuito da encapsulação destas vitaminas é aumentar a sua solubilidade e evitar a sua degradação durante o armazenamento. Tal como referido no capítulo 1 existem vários processos de encapsulação no entanto a técnica de *spray-drying* é a mais utilizada. As maltodextrinas (MD) e a goma acácia (GA) são os polímeros mais utilizados neste processo uma vez que apresentam características desejáveis tais como a baixa viscosidade, alta solubilidade em água e têm um aroma neutro.

4.1.1. Análise de açúcares neutros e ligações glicosídicas

A metodologia de dispersão adotada neste trabalho em relação às vitaminas lipossolúveis foi o encapsulamento à base de biopolímeros, sendo as vitaminas adquiridas já preparadas. Assim era nosso conhecimento que as vitaminas se apresentavam protegidas numa matriz de polissacarídeos e proteínas, no entanto não era conhecida qual a composição química dos mesmos. Assim, com intuito de perceber qual o polissacarídeo envolvido começou-se pela análise quantitativa dos açúcares presentes nas mesmas. Na tabela 2 está representada a concentração de cada açúcar bem com a concentração total de açúcares das amostras que continham vitamina A (AmA), vitamina D3 (AmD3) e vitamina E (AmEF).

Tabela 2- Análise de açúcares das diferentes amostras contendo vitamina A, D3 e E, por GC-FID.

Fração	Hidratos de Carbono (%mol)						Total HC
	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	(mg/g)
AmA	5,7	18,3	0,4	0,6	23,7	51,4	630
AmD3	-	-	-	-	-	100	784
AmEF	-	0,5	9,1	-	17,9	72,4	25

Através da análise da tabela 2 verifica-se que a amostra AmD3 apresenta maior teor em açúcares, apresentando cerca de 784 mg/g. Já a amostra AmEF, apresenta cerca de 25 mg/g de açúcares, sendo o resíduo que apresenta uma mínima quantidade de HC. A amostra AmA contém cerca de 630 mg/g de açúcares. A glucose (Glc) é o monossacarídeo mais abundante em todos os casos, sendo 100% no caso da amostra AmD3.

As maltodextrinas (MD) são muito utilizados na indústria alimentar como material encapsulante (91). Como produto de hidrólise do amido, são caracterizadas como sendo polímeros de glucose linear em ligação (1→4), com ramificações (1→6) (91). Tendo em conta os resultados obtidos para a amostra da vitamina D3 (AmD3), pode-se observar a possível presença de maltodextrina como material encapsulante. Através da análise de açúcares verifica-se a presença de 100% de glucose. Os resultados obtidos para a vitamina A (AmA) indicam a presença de outros açúcares, tais como galactose, arabinose e ramnose.

Podemos também especular sobre a presença da MD na composição do material encapsulante, uma vez que apresenta cerca de 52% de glucose na composição de açúcares. Desta forma existe outro 50% de polissacarídeos presentes.

Uma pesquisa da literatura sobre os possíveis outros polissacarídeos utilizados para efeitos de estabilização em produtos alimentares permitiu encontrar a goma acácia (GA), a qual é muito utilizada na indústria alimentar principalmente devido às suas capacidades emulsificantes (61). No caso da amostra AmA é presumível que esta contenha GA na sua constituição devido à presença de galactose, arabinose e ramnose. Um estudo realizado por Idris *et al* (92) demonstrou que a composição do polissacarídeo da GA era cerca 39-42% de galactose, 24-27% de arabinose, 12-16% de ramnose e 15-16% de ácido glucurónico. Os resultados obtidos no caso da amostra AmA vão de encontro com os resultados observados nos trabalhos anteriores, sendo que a galactose é o monossacarídeo mais abundante seguido da arabinose e da ramnose. A proporção molar entre os valores de galactose e ramnose encontrados são de 1,3, que coincidem com os valores reportados em estudos anteriores e que variou entre 0,6 e 1,6 (92,93). A composição bioquímica e características moleculares da GA podem variar dependendo de fatores internos e externos (espécie da árvore, local, idade e as condições meteorológicas) e nos processos de pós-colheita (condições de armazenamento, tempo de maturação e tratamentos com calor)

(61,92). Mais recentemente (93) também se verificou diferenças entre a composição em açúcares da goma extraída da *Acacia senegal* e *Acacia seyal*. Neste mesmo estudo observou-se que a galactose era o monómero mais abundante seguido da arabinose, ramnose, ácido glucurónico e detetou-se a presença de ácido 4-O-metilglucurónico. Neste caso não foi feita a determinação de ácidos urónicos, o que pode ser o motivo da quantidade menor nos açúcares totais.

No caso da vitamina E (AmEF) era conhecido que esta não estaria encapsulada no entanto sabia-se que estava dispersa num produto desconhecido. Através da análise de açúcares verifica-se que esse produto desconhecido não seria nenhum polissacarídeo devido ao baixo teor em HC, sendo apenas de 25 mg/g. Para perceber qual o material envolvido com esta vitamina foi então realizado um ensaio de FTIR, discutido no capítulo 4.2.1.

Com objetivo de confirmar o carater estrutural dos tipos de polissacarídeos presentes, foi determinado o tipo de ligações glicosídicas dos polissacarídeos nas amostras por análise de metilação. Salienta-se que a análise de metilação é quantitativa para açúcares neutros. Através da análise da tabela 3 verifica-se que a amostra AmA é composta por 58% de glucose da qual 36,1% corresponde a ligações (1 \rightarrow 4) e 26,8% é galactose onde 17,9% são ligações do tipo (1 \rightarrow 3,6). No caso da amostra AmD3 contém 98,8% de glucose e 74,6% correspondem a ligações (1 \rightarrow 4). A amostra AmEF apresenta 76,1% de glucose, o resíduo mais abundante é 1,2,3,4,6-Glc, com 41,5%. A análise da tabela 3, permite concluir que no caso da amostra AmD3, esta contém cerca de 100% de glucose confirma que o polissacarídeo encapsulante seja do tipo maltodextrina (MD). Da análise das ligações glicosídicas da amostra AmA observa-se que a ligação maioritária da Glc é a (1 \rightarrow 4), com 36,1%, confirmando a hipótese da presença de MD (91).

Tabela 3-Análise das ligações glicosídicas dos polissacarídeos por GC-MS.

Ligação Glicosídica	Fração (% mol)		
	AmA	AmD3	AmEF
<i>t</i> -Glc	4,5	13,1	4,9
1,4-Glc	36,1	74,6	26,2
1,6- Glc	0,1	0,1	-
1,3,4- Glc	1,8	0,3	0,5
1,2,4-Glc	-	0,2	-
1,4,6- Glc	1,4	6,5	1,9
1,3,4,6- Glc	8,9	-	1,1
1,2,3,4,6- Glc	5,2	4,0	41,5
Glc Total	58	98,8	76,1
<i>t</i> -Gal	6,2	-	-
1,3- Gal	0,6	-	-
1,4- Gal	-	-	-
1,6- Gal	1,8	-	-
1,3,6- Gal	17,9	-	-
1,2,3,4,6- Gal	0,3	0,2	3,0
Gal Total	26,8	0,2	3,0
<i>t</i> -Araf	5,2		
<i>t</i> -Arap	1,3		
1,2- Araf	0,2		
1,2- Arap	1,2	-	-
1,3-Araf	6,6		
1,4- Ara	-	0,4	-
1,2,3,4- Araf	0,2	0,4	10,1
Total	14,7	0,8	10,1
1,2,3,4,6- Man	0,2	0,2	5,1
Total	0,2	0,2	5,1
1,4- Xyl	-	-	5,9
Total	-	-	5,9

Na continuação da suposição de que existisse um segundo polissacarídeo maioritário foi pesquisado na literatura, que a estrutura mais adequada aos resultados era a GA, como mencionado anteriormente. Este polissacarídeo é descrito como sendo altamente ramificado com uma estrutura base de galactose em ligação (1→3) com ramos laterais ligados à cadeia principal, essencialmente, na posição 6. A estrutura da GA está representada na figura 10 (92–94).



Figura 10- Estrutura da goma acácia. G- galactose, U-ácido glucurónico, Ap-arabinopiranosse, A-arabinose, Um- ácido 4-O-metilglucurónico. Círculo a verde e vermelho dizem respeito à ligação(1→3,6)-Gal.

Os resultados obtidos para a amostra AmA confirmam a presença de galactose em ligação (1→3) com ramificações na posição 6, tal como reportado em estudos de caracterização da goma acácia (93). A ligação glicosídica mais abundante é a (1→3,6)-Gal que se relaciona com a presença de galactose em ligação (1→3) com ramificações na posição 6. O estudo realizado por Lopez-Torrez *et al.* (93) obteve resultados idênticos e observaram que a ligação mais abundante era a (1→3,6)-Gal seguida da (1→3)-Araf e t-Araf. Estes mesmo resultados são observados neste trabalho.

Em conclusão sobre a composição do material encapsulante da amostra AmA, já foi referido anteriormente a possível presença de MD e GA. Uma prova adicional da presença de GA é o acompanhamento característico de proteína nesta goma (20,3 mg/g determinados por análise elementar). No caso da amostra AmD3 terá como material encapsulante a MD e proteínas (148,7 mg/g) (declaradas na ficha técnica do produto).

Os resultados da análise das ramificações dos eventuais polímeros da amostra AmEF indicam que se trata de açúcares livres, que podem ser uma contaminação.

4.1.2. Caracterização por FTIR

Com intuito de reforçar a caracterização química dos polissacarídeos utilizados na encapsulação das vitaminas lipossolúveis foi realizada uma análise por HATR-FTIR de reflexão única. As amostras foram analisadas no estado sólido com intuito de minimizar as contribuições da absorção da água. Foram adquiridos 32 scans, entre 4000 e 600 cm^{-1} ,

resolução 4cm^{-1} de todos os preparados: AmA, AmD3 e AmEF. O espectro obtido para a amostra AmA está apresentado a seguir.

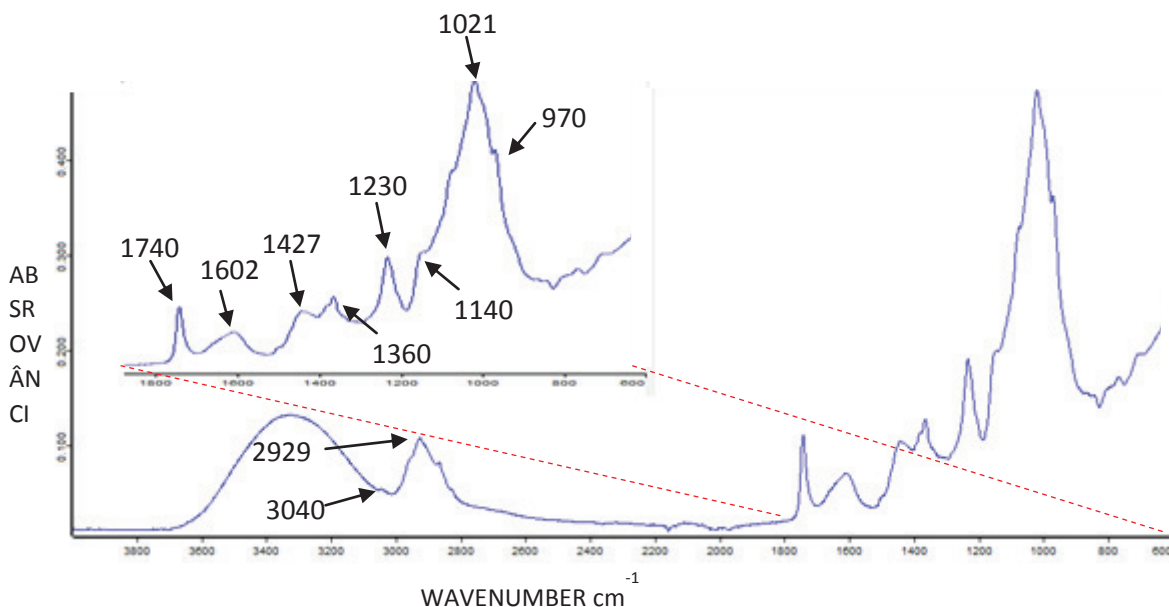


Figura 11- Espectro obtido por FTIR da amostra AmA na região dos 4000 a 600 cm^{-1} .

A análise do espectro mostra a existência de grupos O-H (3600 a 3000 cm^{-1}) os quais podem ser atribuídos à água remanescente e aos polissacarídeos (95,96). É perceptível a 3040 cm^{-1} um pequeno pico que corresponde às duplas ligações da Vitamina A. Igualmente a banda centrada em 2929 cm^{-1} correspondente ao estiramento do C-H do grupo CH_2 , apresenta um ombro a 2960 cm^{-1} , o qual pode atribuir-se aos CH_3 da Vitamina A. A banda a 1740 cm^{-1} é atribuível ao grupo éster do acetato da Vitamina A. Na zona entre 1690 e 1500 cm^{-1} , vemos uma banda ampla com máximo a 1602 cm^{-1} e ombros laterais. A desconvolução desta zona, desdobra esta banda em: os ombros laterais são evidenciados a 1661 cm^{-1} e a 1526 cm^{-1} que podem ser assignados às bandas Amida I e Amida II das proteínas (96) presentes no encapsulante. O pico central definido a 1602 cm^{-1} é atribuível ao grupo carboxilato dos ácidos urónicos da GA.

Como foi referido anteriormente, a GA contém na sua estrutura ácidos urónicos. Estudos referem a presença de bandas na região dos 1740 , 1620 e 1420 cm^{-1} correspondentes a vibração assimétrica dos grupos carboxílicos desprotonados (COO^-) dos ácidos urónicos (93). Assim é possível que a banda centrada a 1427 cm^{-1} contenha a componente simétrica desses mesmos grupos, assim como vibrações dos grupos metileno. O pico a 1231 cm^{-1} é

característico dos acetatos e corresponde ao estiramento do fragmento C-O-C, sendo então originado essencialmente pelo acetato da Vitamina A. A região entre os 1200 e 800 cm^{-1} diz respeito à região dos polissacarídeos, chamada a zona de *fingerprint*, que é denominado pelas vibrações de estiramento dos grupos laterais do (C-OH) e vibrações das ligações glicosídicas (C-O-C) (93,95,96). O pico máximo foi detetado a 1021 cm^{-1} , o qual corresponde à ligação (C-O) de polissacarídeos. Nesta zona é perceptível a presença da MD (comparar com o espectro da amostra AMD3- figura 12 - a qual contém só MD). Para além do pico a 1021 cm^{-1} , podemos ver ombros bem definidos a 1078 e 1150 cm^{-1} que são muito bem definidos e dominantes no espectro da MD. Em resumo o espectro mostra a presença do acetato de vitamina A, a GC e a MD.

O espectro da AmD3 se pode observar a seguir.

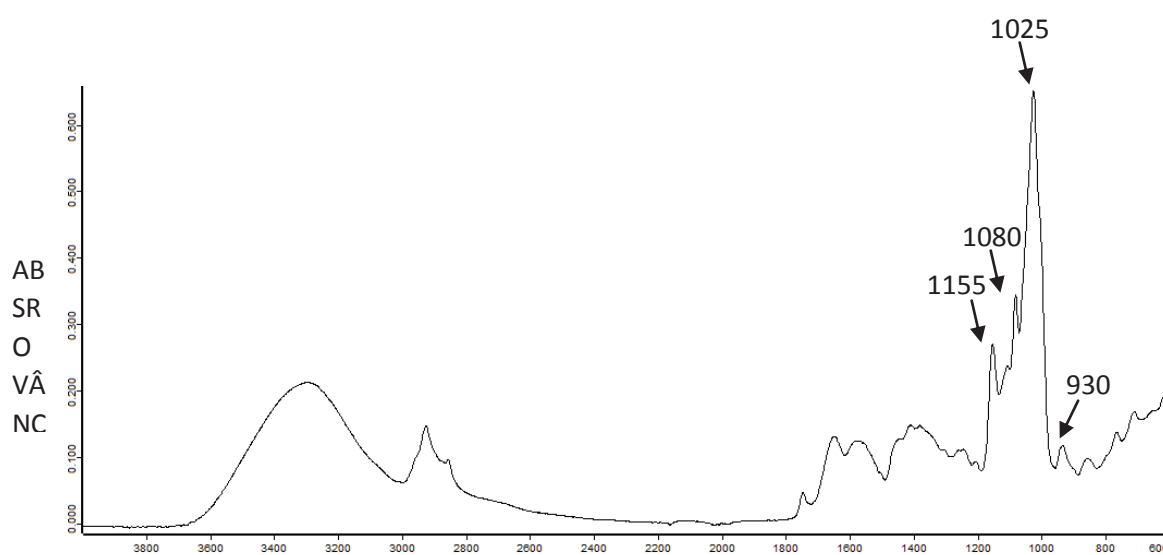


Figura 12- Espectro obtido por FTIR da amostra AmD3 na região dos 4000 a 600 cm^{-1} .

O espectro está dominado pelas bandas da MD na zona entre 1200 e 900 cm^{-1} . A região entre os 1200 e 800 cm^{-1} diz respeito à região dos polissacarídeos, e é chamada a zona de *fingerprint*, que é denominado pelas vibrações de estiramento dos grupos laterais do (C-OH) e vibrações das ligações glicosídicas (C-O-C) (93,95,96). O pico máximo foi detetado a 1021 cm^{-1} , o qual corresponde à ligação (C-O) de polissacarídeos. Nesta banda podemos ver ombros a 1078 e 1150 cm^{-1} que são muito bem definidos e dominantes. O perfil desta banda é característico dos espectros de amido, dextrinas e glicogénio Também são evidentes as bandas de Amida I e Amida II a 1650 e 1550 cm^{-1} , o qual era de esperar, visto a ficha técnica do produto informar que a vitamina D3 está encapsulada numa matriz de

polissacarídeo e proteína. O espectro da Vitamina D3 não é muito evidente, visto os picos deste composto ficarem sobrepostos com as grandes bandas do encapsulante. Na zona do estiramento dos C-H entre 2970 e 2980 cm^{-1} , e na zona do *finger print* (estiramento dos grupos laterais do (C-O) e vibrações das ligações glicosídicas (C-O-C). Atendendo a resultados descritos na literatura, a banda observada a 930 cm^{-1} pode estar relacionada com a presença da ligação glicosídica (1□4) presente no amido (97).

A amostra AmEF foi a que apresentou menor quantidade de açúcares na sua composição química e além disso era conhecido da ficha técnica que a Vitamina E não se encontrava encapsulada. No entanto vinha dispersa num composto desconhecido e as análises FTIR focaram-se essencialmente na deteção do tipo de composto que vinha juntamente com a vitamina E.

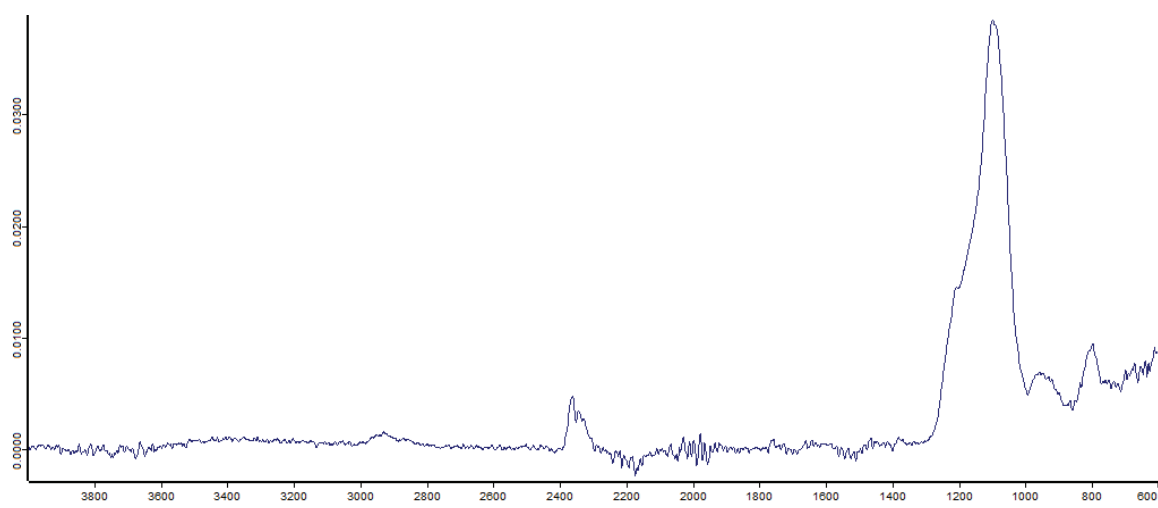


Figura 13- Espectro obtido por FTIR da amostra AmEF na região dos 4000 a 600 cm^{-1} .

O espectro não apresenta bandas de compostos orgânicos e é consistente com o espectro de sílicio. A literatura reporta que o Si-O-Si apresenta uma banda entre 1090 e 1030 cm^{-1} . Podemos conjecturar que se trate de óxido de silício, o qual é usado como aditivo antiaglomerante (E-551) e é considerado inofensivo.

4.1.3. Estabilidade química

A estabilidade química das vitaminas lipossolúveis foi avaliada pela sua quantificação por HPLC. O método utilizado neste trabalho foi um método já desenvolvido pela própria empresa sendo utilizado na quantificação das vitaminas das amostras internas da empresa. Estas vitaminas foram analisadas a T=0, que diz respeito ao momento após produção, T=1, armazenadas após um mês, e T=2, passados 2 meses de armazenamento. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 14.



Figura 14- Percentagem remanescente das vitaminas, A, D3 e E, ao longo de 2 meses.

Após a análise dos resultados é possível observar que a vitamina que apresentou maior perda ao longo dos 2 meses de armazenamento foi a vitamina E, sendo que passados 2 meses apenas 24,2% da vitamina estava presente. De realçar que a VE não estava encapsulada, estava dispersa num material inerte (possivelmente SiO_2 como referido anteriormente).

A vitamina A não apresentou perdas significativas ao longo dos 2 meses de armazenamento ($p < 0,05$). No entanto atendendo aos resultados apresentados na tabela pode-se observar que ocorreu uma ligeira perda na concentração desta vitamina entre T=0 e T=2. Já a vitamina D3 entre T=0 e T=1 não apresentou perdas significativas ($p < 0,05$) no entanto entre T=1 e T=2 já se observaram perdas significativas ($p > 0,05$). O comportamento destas vitaminas ao longo do tempo está relacionado com a encapsulação. No caso da vitamina A, tendo em conta todos os resultados apresentados anteriormente é possível

afirmar a presença de GA, MD e proteínas como material encapsulante. Já no caso da D3 o seu material encapsulante é constituído por MD e proteínas.

Como mencionado no Capítulo 1, a GA é um dos materiais mais comuns utilizados nos processos de encapsulação. Embora apresente muitas características desejáveis para ser um bom agente encapsulante como alta solubilidade, baixa viscosidade e boas propriedades emulsificantes o seu custo elevado e oferta limitada têm levado a restrições da sua utilização como único material encapsulante (75–77). A atividade emulsionante da GA é atribuída à presença de proteína, ligada covalentemente com estruturas de polissacarídeos altamente ramificados. No nosso caso, verificou-se a presença de uma quantidade pequena de proteína (20,3 mg/g) e já foi conjecturado no ponto (4.1.1) que esta é a proteína que está reportada com acompanhando a GA. No entanto, a variação da oferta e o aumento dos preços, está a levar a uma procura de materiais alternativos que possam substituir ou ser utilizados em combinação com a GA (75–77).

As maltodextrinas (MD), resultantes da hidrólise do amido, são polímeros muito usados uma vez que apresentam custo relativamente baixo, um aroma neutro, baixa viscosidade e oferece uma boa proteção contra a oxidação. No entanto, o maior problema deste material é a sua baixa capacidade de emulsificação. Portanto, como é discutido anteriormente é desejável a utilização de MD em combinação com outros polímeros tais como a GA (com a sua proteína) ou outras proteínas. Um estudo (75) realizado com óleo de abacate encapsulado com MD e proteínas demonstrou um melhor comportamento face à oxidação no encapsulado quando comparado com o óleo não encapsulado. Este trabalho foi realizado ao longo de 8 semanas onde se avaliou a formação de peróxidos a diferentes temperaturas. Observou-se um aumento significativo na formação de peróxidos no óleo não encapsulado, a partir da 6 semana a 60°C. No caso do óleo encapsulado verificou-se uma formação de peróxidos inferior, reforçando o melhoramento da estabilidade oxidativa na presença de encapsulação (75).

Tal como se observou neste trabalho, as vitaminas que estavam encapsuladas foram as que apresentaram uma maior estabilidade ao longo do tempo de armazenamento. Sabemos da literatura que a VA e VD são altamente sensíveis ao oxigénio, à luz e à humidade, podendo a VA ser ligeiramente mais sensível que a D3 (73). No nosso caso a vitamina A demonstrou ser mais estável do que a vitamina D3, o que pode estar relacionado com a constituição do material encapsulante. Foi referido no capítulo 1 que o encapsulamento

com GA é mais eficiente, e que este processo está relacionado com a sua estrutura mais ramificada e consequentemente a formação de partículas cuja porosidade é menor e assim os compostos encapsulados ficam mais protegidos no seu interior (62). Relacionando os resultados da literatura com os nossos resultados verificamos uma maior proteção das vitaminas quando estas se encontram encapsuladas, principalmente quando contêm GA. Assim, a menor perda da vitamina A ao longo deste trabalho pode-se relacionar com uma maior proteção exercida pela GA. Já a vitamina D3 como contém MD na sua constituição, a porosidade pode ser superior, como referido na literatura, existindo assim um maior contacto com agentes oxidantes externos que levam à sua destruição.

A vitamina E foi a vitamina que sofreu uma maior perda, tendo sido degradada cerca de 75% ao longo de 2 meses. Na análise T=0 (imediatamente após a dispersão em água) já se observou uma perda da vitamina de cerca de 15%, demonstrando a sua instabilidade (figura 13). Tal como é referido no capítulo 1 esta vitamina é bastante sensível a fatores como a luz e oxigénio (68,69,98).

Uma vez que esta vitamina não se encontrava encapsulada, o contato com o oxigénio e luz durante a produção foi inevitável. Consequentemente estes fatores podem ter interferido com a estabilidade desta vitamina. A figura 15 apresenta os cromatogramas de HPLC do padrão (o preparado a introduzir na suspensão) e do preparado em suspensão a T=2, mostrando como o pico da VE inicial sofreu uma diminuição apreciável, enquanto aparecem outros picos, que devem corresponder aos produtos de degradação/oxidação ou aos outros componentes do produto.

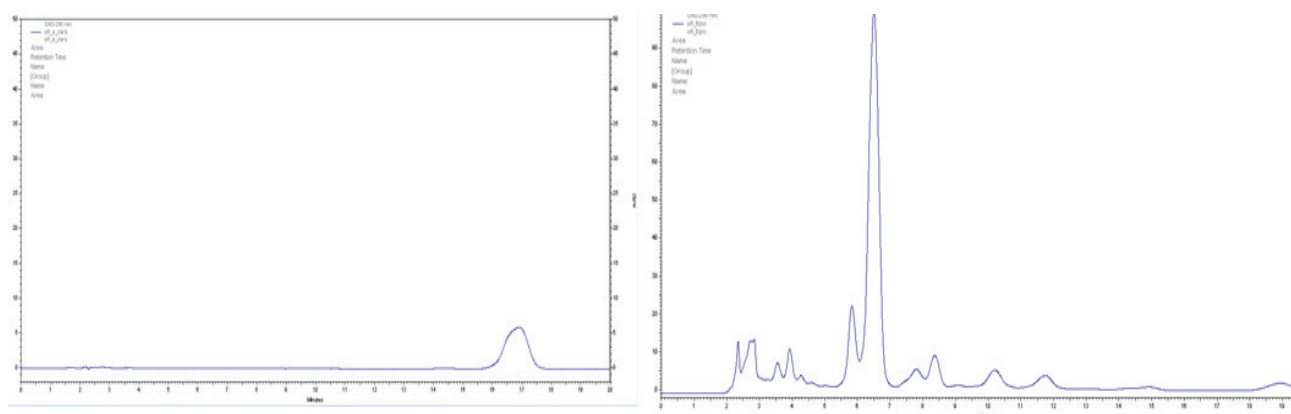


Figura 15- Cromatograma do padrão da vitamina E (lado esquerdo). Cromatograma do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=2 (imagem do lado direito) 290 nm.

Apesar dos frascos serem fechados em azoto, a eliminação de todo o oxigénio pode não ter sido eficiente. Um estudo (69) refere uma destruição da vitamina E diferente dependendo do tipo de solvente utilizado. Foram comparados dois solventes, o hexano e metanol, e observaram uma destruição mais acentuada quando utilizado o hexano. Este facto foi relacionado com a maior taxa de dissolução do O₂ neste solvente e consequentemente uma maior oxidação da vitamina E. Estudo mais antigo (68) corroboram com estes resultados onde se observou uma taxa de destruição da vitamina E diferente dependendo do tipo de saco utilizado. Neste trabalho também verificaram que os sacos cuja permeabilidade para o O₂ era maior, a taxa de destruição da vitamina E também era maior (68). A adição de antioxidantes fortes como o ácido ascórbico poderia ser benéfico no aumento da estabilidade da vitamina E. Este poderia proporcionar um efeito protetor contra a decomposição da vitamina. No entanto a quantidade adicionada deveria ser estudada uma vez que após oxidação, o ácido ascórbico torna-se num pro-oxidante podendo causar a peroxidação da vitamina E (98).

Em conclusão é importante salientar o efeito protetor que os encapsulantes exercem sobre as vitaminas. As vitaminas A e D3 apresentaram-se mais estáveis uma vez que se encontravam encapsuladas e assim estavam protegidas contra o contacto com agentes que provocam a sua destruição. Já a vitamina E, como não se encontrava protegida, a sua destruição foi mais acentuada e rápida. Esta vitamina esteve mais sujeita à oxidação, tal como se observou neste trabalho. Assim é importante a utilização desta vitamina na forma encapsulada ou então a utilização de agentes antioxidantes que evitem a sua oxidação.

4.2. Vitaminas hidrossolúveis e minerais

4.2.1. Desenvolvimento inicial do produto

No produto constituído por vitaminas hidrossolúveis e minerais começou-se por dissolver os minerais e posteriormente juntou-se as vitaminas. Este produto foi desenvolvido apenas no laboratório, não tendo ainda sido testado no misturador de líquidos da empresa. Inicialmente foram dissolvidos todas as vitaminas e minerais com intuito de perceber quais as alterações que poderiam ocorrer a nível visual. Após a junção das vitaminas aos minerais já dissolvidos verifica-se uma rápida alteração de cor. Com intuito de perceber qual a reação que estava a ocorrer foram feitos vários testes, onde se dissolveu a vitamina

C com os diferentes minerais, separadamente. Perante isto, observou-se que a alteração de cor ocorria após a adição de selenito de sódio (Na_2SeO_3) à solução de vitamina C, passando de incolor para vermelho escuro e após a adição de cobre (Cu^{2+}) o produto adquiriria uma cor negra com depósito no fundo, tal como se pode observar na figura 16.

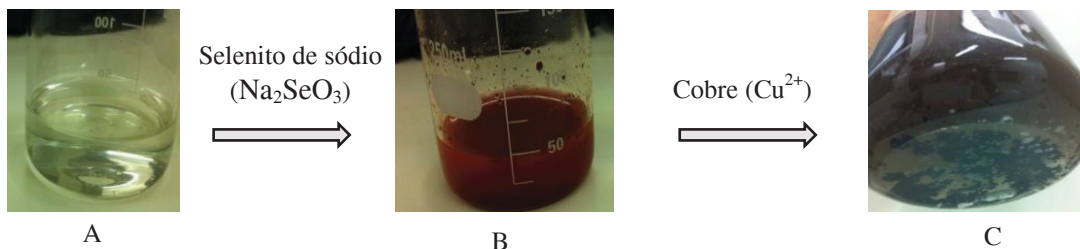


Figura 16- Esquema de dissolução da vitamina C com os minerais. A- Vitamina C dissolvida em água destilada. B- Junção de selenito de sódio à solução de vitamina C. C- Adição de cobre à solução de vitamina C e selenito de sódio.

Um dos grandes entraves encontrados pela empresa na produção deste produto era a sedimentação do mesmo, da qual não era conhecida a razão. Assim verificou-se que após a junção da VC com o selenito de sódio, instantaneamente observava-se a alteração de cor para vermelho escuro. Vários estudos referem a oxidação da VC na presença de Se (IV) levando à formação de Se (0), o qual para além de apresentar coloração vermelha tem uma baixa solubilidade em água (99–101). Shaker (100) realizou um estudo onde observou a cinética de redução do selenito (Se (IV)) a selénio elementar (Se (0)) pela VC. A presença do Se (0) foi detetada espectralmente devido à sua coloração vermelha escura, tal como foi observado na figura 16 (100). A formação de Se (0) é muitas vezes utilizada com intuito de remover o Se das águas uma vez que este é insolúvel e apresenta uma cor avermelhada, e assim a sua eliminação torna-se mais fácil (101). O processo de redução do selenito pela VC pode ser descrito pela reação geral:



Figura 17- Mecanismo de redução do selenito na presença de VC. Adaptado de (99,100)

Esta reação é favorecida a pH baixos, sendo que trabalhos anteriores relatam que a faixa de pH de 0,5-3,5 é a que mais favorece a reação (99,100). No sistema aquoso o mecanismo reacional envolve um equilíbrio de dissociação rápida do ácido ascórbico (vitamina C) a ião ascorbato. Quanto menor o pH maior a $[\text{H}^+]$ e consequentemente menor será a dissociação e maior a concentração de ácido ascórbico na solução. Assim sendo maior será a taxa de conversão de Se (IV) a Se (0). Pettine *et al.* (99) também estudaram a reação

entre o Se (IV) e VC em função do pH, temperatura e força iônica. Neste trabalho observaram que a gama de pH mais favorável foi entre 1-5,5, tal como tinha sido verificado em trabalhos anteriores (99–101). No caso do produto objeto deste estudo, (com vitaminas e minerais) o pH era de 3,25, o que reproduz as condições dos estudos mencionados que relatam que o pH ácido favorece a reação de oxidação do Se (IV) a Se elementar, sendo este o processo que está a ocorrer no nosso produto.

Por outro lado, após a adição de Cu^{2+} à solução B (vitamina C e selenito de sódio) verifica-se uma alteração de vermelho escuro, para uma coloração escura seguida da formação de um depósito. Vários trabalhos referem a formação de selenetos de cobre (CuSe) após a junção de Cu^{2+} a uma solução contendo selenito (102,103) e assim após várias pesquisas pode-se pressupor que o composto formado é o seleneto de cobre. Este composto pode apresentar diferentes formas estruturais com diferentes estequiometrias tais como CuSe , CuSe_2 , Cu_2Se , entre outras, dependendo do estado de oxidação. Chen *et al.* (103) desenvolverem nanofios de seleneto de cobre numa solução aquosa contendo selênio e nitrato de cobre (II) ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$). Após a dissolução completa do selênio, que apresentava coloração vermelha escura, foi adicionado o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, obtendo-se um precipitado de cor preta, que representa a formação do seleneto de cobre. Este resultado é também observado neste trabalho. Gosavi *et al.* (102) também obtiveram nanofios de CuSe através da dissolução de Na_2SeO_3 com cloreto de cobre II (CuCl_2). Perante isto é suscetível que o precipitado que se formou no nosso caso seja seleneto de cobre, uma vez que se formou um precipitado no fundo com coloração escura. No entanto este precipitado não foi caracterizado e por esta razão não é possível afirmar com certeza qual a natureza do mesmo. Não era objetivo nem interesse para a empresa caracterizar o precipitado mas sim descobrir qual a razão do seu aparecimento de modo a tentar evitá-lo.

4.2.2. Influência do precipitado nas vitaminas

Para perceber qual a consequência da formação do precipitado na mistura de vitaminas e minerais realizou-se uma análise de HPLC-DAD (com detetor *diode array*) para determinar o teor de vitaminas no tempo zero. Esta análise foi feita segundo o método utilizado na própria empresa, onde se analisaram a vitamina C, B1, B3 e B6 por HPLC. No caso do produto que só não continha vitamina C, a percentagem de perda da vitamina B1, B3 e B6 foi de 6,0%, 6,3% e 6,9%, respetivamente. No caso do produto que continha

vitamina C, no qual se observou a formação de precipitado, a percentagem de perda da vitamina B1, B3 e B6 foi de 16,0%, 53,4% e 26,1%, respetivamente.

Os resultados estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 4- Percentagem de perda da vit. C, B1, B3 e B6 no produto com e sem vitamina C. N.P- não se detetou pico referente à vitamina C.

Produto com vitamina C		Produto sem vitamina C
		% Perda
Vit. C	N.P	-
B1	16,0	6,0
B3	53,4	6,3
B6	26,1	6,9

O produto que continha vitamina C, não se observou o pico correspondente à vitamina, o que leva a concluir que esta não se manteve estável. A VC é a menos estável em ambientes líquidos, como é o caso da nutrição parenteral (79,104). Esta é facilmente oxidada, estimulada principalmente pela temperatura, pela presença de oxigénio e metais como o cobre, tal como já foi referido no capítulo 1 (105).

Além desta vitamina estar envolvida na redução do selenito a selénio elementar e consequente produção de selenetos de cobre na presença de Cu^{2+} , esta também pode levar à geração de ROS, tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio singuleto ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (80,105). No entanto a vitamina C é extremamente sensível na presença de oxigénio e são vários os estudos que relacionam a sua degradação com a presença de O_2 . Dupertuis *et al.* (106) estudaram a degradação da vitamina C usando sacos com diferente teor inicial de O_2 e diferente permeabilidade para este gás. Observaram uma perda de cerca de 45% da vitamina C quando o teor inicial de oxigénio era de 5 ppm nas primeiras 6h, e uma perda de menos 10% quando o teor de O_2 era de 1 ppm. Por outro lado verificaram também uma perda superior da vitamina quando esta foi armazenada em sacos com maior permeabilidade ao O_2 , quando comparado com a utilização de sacos cuja permeabilidade era quase nula (106). Assim é então possível afirmar que o oxigénio é o principal fator que afeta a degradação da vitamina C, levando a sua oxidação. Uma vez que o nosso produto foi inicialmente produzido em ambiente normal, na presença de O_2 é esperado que a vitamina C sofra oxidação e consequentemente não seja detetada na análise por HPLC-DAD. Perante este acontecimento ficou decidido retirar a vitamina C do suplemento uma

vez que esta foi facilmente oxidada e a sua presença juntamente com os metais levou à formação de precipitados que interferiram na estabilidade das outras vitaminas.

4.2.3. Estudo da estabilidade das vitaminas hidrossolúveis em meio aquoso

O objetivo do trabalho não passava pela validação de um método mas sim pela determinação da concentração da vitamina e avaliar a sua estabilidade ao longo do tempo. Assim foi utilizado um método já desenvolvido e descrito na literatura (90). No entanto foi avaliada a linearidade para cada vitamina, e os coeficientes de correlação (R) obtidos para todos os casos demonstram que o método apresenta boa correlação com R a variar entre 0,998 e 0,999. A exatidão do método foi também obtida através da realização de ensaios de recuperação, adicionando à amostra concentrações conhecidas do padrão, tendo-se obtido valores de 98,4% para a B2, 93,7% para a B9 e 102% para a B6.

Com intuito de perceber e de determinar a concentração das vitaminas ao longo do tempo foi então preparado 500 mL do produto e posteriormente foram distribuídos em frascos opacos de 150 mL (2 frascos). O frasco 1 servia para a análise do tempo 0 (após produção), mês 1 e mês 2 e o frasco 2 para o mês 3 e mês 4. Os resultados obtidos estão representados no gráfico abaixo (figura 18), em que o resultado diz respeito à quantidade de vitamina remanescente na amostra. A tabela 5, corresponde aos mesmos resultados mas estão apresentados de uma forma mais explícita. Perante os resultados apresentados verifica-se que a vitamina B9 foi a vitamina que sofreu uma maior percentagem de perda imediatamente após produção com cerca de 35,7%. A B2 apresentou perdas de 7%, a B6 com 3% e as vitaminas B3 e B1 apresentaram valores de cerca de 100%. A vitamina B9 apresentou uma perda de cerca de 80% após 4 meses de armazenamento. Apesar da vitamina B9 ter sido a vitamina em que se observou maior perda em T=0, com o passar do tempo de armazenamento foi a vitamina B2 que apresentou um decréscimo maior, tendo sido perdida cerca de 98% passados 4 meses.

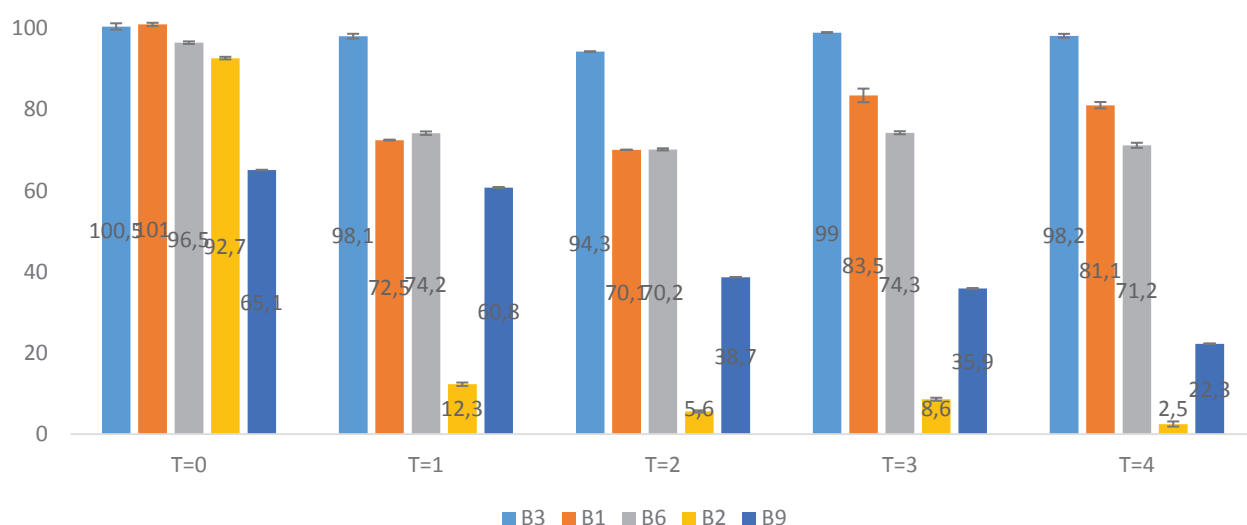


Figura 18- - Percentagem de vitaminas remanescente no produto (sem adição de VC) ao longo do tempo. T=0 - após produção; T=1 - análise no mês 1; T=2 - análise no mês 2; T=3 - análise no mês 3; T=4 - análise no mês 4. As barras no gráfico dizem respeito aos desvios padrões.

Os resultados do gráfico estão apresentados de uma forma mais clara na tabela 5 apresentada abaixo.

Tabela 5- Percentagem remanescente das vitaminas ao longo do tempo de armazenamento, seguida do valor do desvio padrão.

Vitamina	% Remanescente				
	T=0	T=1	T=2	T=3	T=4
B3	100,5 ± 0,78	98,1 ± 0,60	94,3 ± 0,10	99 ± 0,10	98,2 ± 0,48
B1	101 ± 0,40	72,5 ± 0,11	70,1 ± 0,05	83,5 ± 1,68	81,1 ± 0,78
B6	96,5 ± 0,32	74,2 ± 0,42	70,2 ± 0,27	74,3 ± 0,38	71,2 ± 0,63
B2	92,7 ± 0,32	12,3 ± 0,10	5,6 ± 0,09	8,6 ± 0,10	2,5 ± 0,11
B9	65,1 ± 0,83	60,8 ± 0,96	38,7 ± 0,16	35,9 ± 0,43	22,3 ± 0,44

A vitamina mais estável foi a vitamina B3 (niacinamida) tendo sido obtidos valores acima dos 90% ao longo dos 4 meses. Existem poucos trabalhos sobre a estabilidade desta vitamina em ambientes aquosos no entanto a sua estabilidade neste trabalho foi verificada. Além disso várias referências referem que esta vitamina não é sensível a fatores como a luz e oxigénio (107). A vitamina B1 teve uma perda de cerca de 20% e a B6 uma perda de 30% em T=4. É também possível observar que os resultados em T=3 não sofreram um

decréscimo, com exceção da vitamina B9, ao contrário que era esperado. Este facto relaciona-se com a abertura de um novo frasco armazenado, que ainda não tinha sido aberto e consequentemente não tinha estado em contacto com o O₂ após a sua produção. E assim, pode-se afirmar que a presença de O₂ influencia a estabilidade das vitaminas, estando associado à sua destruição.

Uma das razões que pode ter levado à perda do ácido fólico neste trabalho pode estar relacionado com a presença de O₂ e a luz durante a produção do produto. Como já foi referido anteriormente o produto foi produzido em laboratório na presença de oxigénio só posteriormente embalado em atmosfera de N₂. Perante isto, a perda do ácido fólico pode seguir o esquema representado na figura 8 do cap. 1, e assim a grande perda observada em T=0. A atmosfera envolvente a esta vitamina é muito importante em relação à sua estabilidade. A presença de O₂ está associada a uma maior destruição do ácido fólico e Araújo *et al.* (85) também estudaram a sua degradação a diferente pH e atmosfera (O₂ e N₂). Os resultados obtidos relatam uma dependência da degradação da vitamina com o tipo de atmosfera utilizada, observando uma maior perda na presença de O₂ quando comparada com N₂. Por outro lado também observaram uma diminuição na degradação do ácido fólico quando o pH se tornava mais básico (85). Assim sendo, o ácido fólico apresentou-se como uma vitamina muito sensível, tendo uma diminuição de cerca de 80% passados 4 meses. O pH ácido do produto, cerca de 3,25, influenciou esta destruição, tal como foi descrito em trabalhos anteriores. Por outro lado o O₂ e a quantidade de luz presentes durante a produção do produto e durante a sua abertura são fatores fulcrais que deveriam ser controlados com intuito de diminuir a destruição desta vitamina.

A riboflavina (B2) foi a vitamina que sofreu uma maior percentagem de destruição ao longo do tempo de armazenamento, cerca de 98%. É uma vitamina muito sensível à presença de luz e oxigénio, tal como ácido fólico. Como já foi referido no capítulo 1, a riboflavina na presença da luz fica no estado tripleto e na presença de oxigénio leva à formação de ROS, tais como oxigénio singuleto (O₂[•]) (aa). Por outro lado esta vitamina na presença de luz também pode sofrer uma clivagem dando origem à lumino flavina, tal como se observa na figura 18 (108).

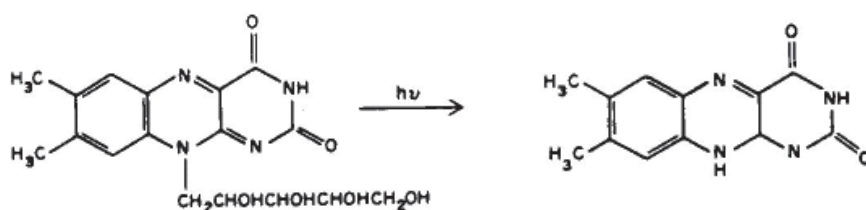


Figura 19- Fotoclivagem da riboflavina na presença de luz originando lumino flavina. Adaptado de (108).

Esta vitamina além de ser destruída produz ROS, como já foi referido, que estão envolvidos na estabilidade de outras vitaminas. Já foi referido no capítulo 1 que a riboflavina funciona como fotosensibilizador para a destruição de outras vitaminas, como é o caso do ácido fólico levando à sua destruição (82). Vários estudos têm sido desenvolvidos com intuito de entender o mecanismo de degradação a riboflavina (109–111). Hall *et al.* (109) desenvolveram um trabalho onde analisaram a perda da riboflavina no leite na presença de antioxidantes como o trolox e ácido ascórbico. Começaram por verificar que na presença da vitamina o teor de oxigénio no espaço de cabeça da embalagem do leite diminuía significativamente quando comparado com o leite que não possuía a vitamina. Esta diminuição estava associada a formação de oxigénio singuleto. A adição do trolox e o ácido ascórbico levaram a uma diminuição significativa da perda da vitamina B2, sendo que na ausência destes produtos 100% da riboflavina tinha sido perdida em 9h. A proteção na presença dos antioxidantes foi associado à eliminação do 1O_2 produzidos pela riboflavina (109). O ácido ascórbico tem então efeitos protetores na riboflavina e um estudo refere que na presença de luz a vitamina B2 apresentou perdas de 94% e 15,7% na ausência e presença de ácido ascórbico, respetivamente. Um dado importante deste trabalho refere um modo de proteção diferente do ácido ascórbico, sendo referido que este além de eliminar o 1O_2 , está também envolvido na eliminação da riboflavina no estado tripleto (111). O 1O_2 produzido pela riboflavina é uma molécula é extremamente reativa sendo que é referido que reage com a vitamina numa razão de 1.01×10^{10} M/s (109,111). A presença dos iões metálicos também poderia afetar a estabilidade da vitamina ao longo do tempo de armazenamento, no entanto Astanov *et al.* (110) realizaram um estudo onde demonstraram que a destruição da riboflavina na presença de iões metálicos era retardada. Referiram que este facto poderia estar relacionado com a formação de complexos entre os átomos de oxigénio dos grupos carbonilo com os iões metálicos. Ao

estudarem a estrutura molecular da vitamina observaram que a carga negativa se maximizada nos oxigénios do grupo carbonilo, assumindo a formação de complexos com os iões. Assim, em soluções aquosas com iões metálicos, a destruição da riboflavina através da eliminação da cadeia lateral é inibida devido à formação do complexo. Contudo não se encontram estudos que refiram a estabilidade de todas as vitaminas com todos os metais em causa.

Os ROS originados pela riboflavina têm um efeito destrutivo podendo causar oxidação das outras vitaminas. Portanto seria importante controlar este fator e um estudo realizado por Mahendran *et al.* (112) avaliou a eficiência de eliminação do oxigénio singuleto produzido pela riboflavina com a utilização de microcápsulas de GA. Observaram uma eficiência significativa na eliminação deste composto com a utilização desta microcápsula, associando à interação dos resíduos dos aminoácidos na porção proteica da GA. Outro estudo (113) também avalia a fotoestabilidade da riboflavina quando encapsulada em microcápsulas de GA. Verificaram uma diminuição da constante de velocidade da fotodegradação da vitamina em cerca de 26%. Uma análise cinética dos resultados indica que o efeito protetor da encapsulação é principalmente devido à combinação de extinção do estado tripleto da vitamina e eliminação dos ROS formados. Por outro lado também atribuíram, com menor contribuição, o efeito filtro que a microcápsula exerce na vitamina e consequentemente bloqueia a excitação da riboflavina para o estado tripleto (113). Uma estratégia para diminuir a oxidação desta vitamina e evitar a degradação de outras vitaminas seria a sua utilização na forma encapsulada. Além da inibição da sua capacidade foto sensibilizadora, também seria evitado a degradação da própria vitamina. Assim este processo seria uma utilização promissora no controlo da estabilidade da riboflavina e das outras vitaminas.

A vitamina B6 também apresentou uma diminuição significativa após 3 meses de armazenamento, cerca de 30%. Esta vitamina é conhecida por ser sensível à luz, no entanto existem informações limitadas sobre a sua estabilidade em aditivos líquidos. A instabilidade na presença da luz tem sido descrita, Chen *et al.* (66) relataram uma perda de 86% da vitamina após 8h de incidência de luz. No entanto mais recentemente Ribeiro *et al.* (85) verificaram que esta vitamina era estável durante 3 dias sem foto-proteção. Assim, a extensão da influência da luz na estabilidade desta vitamina é difícil de analisar. Neste trabalho observamos uma diminuição significativa desta vitamina ao longo dos 4 meses de

armazenamento podendo relacionar-se com a presença de luz. No entanto seriam necessários mais estudos onde fosse possível observar o real efeito da luz sobre esta vitamina.

A tiamina foi também uma vitamina que sofreu uma destruição de cerca de 30% ao longo dos 4 meses de armazenamento. Um estudo antigo (66) já descrito anteriormente não observou perdas significativas da vitamina B1 durante 8h na presença de luz. Por outro lado um estudo antigo (114) também refere que a tiamina se mantém estável em ambientes aquosos contendo minerais no entanto na presença de outras vitaminas observaram uma diminuição da sua concentração. No entanto a extensão das interações das vitaminas no produto são pouco estudadas e ainda desconhecidas.

Em conclusão, este suplemento com vitaminas e minerais é caracterizado por apresentar um sistema muito complexo. Na literatura encontra-se pouca informação sobre a estabilidade deste tipo de suplementos, encontra-se mais informação de suplementos vitamínicos isoladas. Neste trabalho seriam necessários mais estudos para averiguar qual a influência de fatores como o O₂ e luz na estabilidade das vitaminas. Por outro lado os frascos utilizados neste trabalho eram semi permeáveis à luz (referido na ficha técnica), e assim não é conhecido qual o grau de permeabilização e qual a sua influência na estabilidade das vitaminas.

Capítulo 5 – Conclusão e perspectivas futuras

Perante todos os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que ambos os produtos se apresentaram instáveis ao longo do tempo de armazenamento. Em relação ao produto contendo as vitaminas lipossolúveis a vitamina E foi a que sofreu maior perda. Já a vitamina A e D3 demonstraram-se mais estáveis, facto que pode estar relacionado com a sua encapsulação e consequentemente encontram-se mais protegidas. Perante as análises químicas realizadas pode-se verificar que a vitamina A encontra-se encapsulada numa matriz constituída por goma acácia, maltodextrina e proteína já a vitamina D3 encontra-se envolvida numa matriz de maltodextrinas e proteínas. Estas matrizes poderão estar relacionados com a maior estabilidade destas vitaminas no produto líquido. A vitamina E encontra-se dispersa em sílica e assim fica mais exposta ao contacto com agentes externos sendo que a sua destruição pode relacionar-se com este facto. Já o produto composto por vitaminas hidrossolúveis e minerais também não se apresentou estável ao longo do tempo de armazenamento. A vitamina B2 foi a que se apresentou menos estável seguida da vitamina B9, apresentando valores de perda de quase 100% e 80%, respetivamente. Fatores como a luz e O₂ podem estar fortemente relacionados com estas perdas, e assim seria importante controlar estes fatores.

Futuramente seria importante realizar uma análise mais extensiva ao tempo de armazenamento do produto. Estudar a influência da adição de antioxidantes ao produto seria também vantajoso para perceber qual o seu efeito na estabilidade do produto. No caso do produto com vitaminas e minerais, como se observaram perdas maiores quando o produto foi aberto, estudar a verdadeira influência da luz e do O₂ na estabilidade destas vitaminas seria também importante. A utilização das vitaminas na forma encapsulada poderia ser uma estratégia a utilizar com intuito de aumentar a sua estabilidade. Por outro lado seria interessante produzir um produto só com vitaminas hidrossolúveis e avaliar a sua estabilidade ao longo do tempo, percebendo se a presença dos minerais realmente influenciou a estabilidade das vitaminas.

Capítulo 6 – Referências bibliográficas

- (1) Shergill-Bonner, R. (2013) Micronutrients. *Paediatr. Child Health (Oxford)*. 23, 331–336.
- (2) Sacadura, F. C., Robinson, P. H., Evans, E., and Lordelo, M. (2008) Effects of a ruminally protected B-vitamin supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 111–124.
- (3) Jin, L., Yan, S., Shi, B., Bao, H., Gong, J., Guo, X., and Li, J. (2014) Effects of vitamin A on the milk performance, antioxidant functions and immune functions of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 192, 15–23.
- (4) Formigoni, A., Fustini, M., Archetti, L., Emanuele, S., Sniffen, C., and Biagi, G. (2011) Effects of an organic source of copper, manganese and zinc on dairy cattle productive performance, health status and fertility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164, 191–198.
- (5) Lesson, S. (2007) Vitamin requirements: is there basis for re-evaluating dietary specifications? *Worlds. Poult. Sci. J.* 63, 255–266.
- (6) Ma, X., Yang, Z., Yang, W., and Song, M. (2005) Effects of different vitamin A levels in diets on antioxidant ability of beef cattle. *Chin. J. Anim. Nutr* 7, 31–35.
- (7) Iwasaki-Ishizuka, Y., Yamato, H., Murayama, H., Ezawa, I., Kurokawa, K., and Fukagawa, M. (2005) Menatetrenone rescues bone loss by improving osteoblast dysfunction in rats immobilized by sciatic neurectomy. *Life Sci.* 76, 1721–34.
- (8) Nääs, I. de A., Baracho, M. dos S., Bueno, L., Moura, D. de, Vercelino, R. do A., and Salgado, D. (2012) Use of vitamin D to reduce lameness in broilers reared in harsh environments. *Rev. Bras. Ciência Avícola* 14, 165–172.
- (9) Conaway, H. H., Henning, P., and Lerner, U. H. (2013) Vitamin A Metabolism, Action, and Role in Skeletal Homeostasis. *Endocr. Rev.* 34, 766–797.
- (10) Kandasamy, S., Chattha, K. S., Vlasova, A. N., and Saif, L. J. (2014) Prenatal vitamin A deficiency impairs adaptive immune responses to pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq®) in a neonatal gnotobiotic pig model. *Vaccine* 32, 816–824.
- (11) Vlasova, A. N., Chattha, K. S., Kandasamy, S., Siegmund, C. S., and Saif, L. J. (2013) Prenatally acquired vitamin A deficiency alters innate immune responses to human rotavirus in a gnotobiotic pig model. *J. Immunol.* 190, 4742–53.
- (12) Guo, Y., Tang, Q., Yuan, J., and Jiang, Z. (2001) Effects of supplementation with vitamin E on the performance and the tissue peroxidation of broiler chicks and the stability of thigh meat against oxidative deterioration. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89, 165–173.
- (13) Yousef, M. ., Abdallah, G. ., and Kamel, K. . (2003) Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 76, 99–111.
- (14) Hashem, N. M., El-Hady, A. A., and Hassan, O. (2013) Effect of vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season. *Livest. Sci.* 157, 520–526.
- (15) Ebeid, T. A., Zeweil, H. S., Basyony, M. M., Dosoky, W. M., and Badry, H. (2013) Fortification of rabbit diets with vitamin E or selenium affects growth performance, lipid peroxidation, oxidative status and immune response in growing rabbits. *Livest. Sci.* 155, 323–331.
- (16) Guzmán-Guillén, R., Prieto Ortega, A. I., Martín-Caméan, A., and Cameán, A. M. (2015) Beneficial effects of vitamin E supplementation against the oxidative stress on *Cyindrospermopsis*-exposed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicon* 104, 34–42.
- (17) Cannon, J. E., Morgan, J. B., Schmidt, G. R., Tatum, J. D., Sofos, J. N., Smith, G. C., Delmore, R. J., and Williams, S. N. (1996) Growth and fresh meat quality characteristics of pigs supplemented with vitamin E. *J. Anim. Sci.* 74, 98–105.
- (18) Burild, A., Frandsen, H. L., Poulsen, M., and Jakobsen, J. (2015) Tissue content of vitamin D3 and 25-hydroxy vitamin D3 in minipigs after cutaneous synthesis, supplementation and deprivation of vitamin D3. *Steroids* 98, 72–9.
- (19) Rath, N. C., Kannan, L., Pillai, P. B., Huff, W. E., Huff, G. R., Horst, R. L., and Emmert, J. L. (2007)

Evaluation of the efficacy of vitamin D3 or its metabolites on thiram-induced tibial dyschondroplasia in chickens. *Res. Vet. Sci.* 83, 244–50.

(20) Majee, D. N., Schwab, E. C., Bertics, S. J., Seymour, W. M., and Shaver, R. D. (2003) Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. *J. Dairy Sci.* 86, 2106–12.

(21) Zimmerly, C. A., and Weiss, W. P. (2001) Effects of supplemental dietary biotin on performance of Holstein cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 84, 498–506.

(22) Preynat, A., Lapierre, H., Thivierge, M. C., Palin, M. F., Matte, J. J., Desrochers, A., and Girard, C. L. (2009) Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 677–89.

(23) Preynat, A., Lapierre, H., Thivierge, M. C., Palin, M. F., Cardinault, N., Matte, J. J., Desrochers, A., and Girard, C. L. (2010) Effects of supplementary folic acid and vitamin B(12) on hepatic metabolism of dairy cows according to methionine supply. *J. Dairy Sci.* 93, 2130–42.

(24) Shaver, R. D., and Bal, M. A. (2000) Effect of dietary thiamin supplementation on milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 2335–40.

(25) Ramos, J. J., Marca, C., Ferrer, L. M., Loste, A., and Cebrián, L. M. (2006) Faecal thiaminase, plasma lactate and pyruvate concentrations and erythrocyte transketolase activity changes in apparently normal replacement ewes after the initiation to the pasture. *Res. Vet. Sci.* 80, 11–6.

(26) Amat, S., McKinnon, J. J., Olkowski, A. A., Penner, G. B., Simko, E., Shand, P. J., and Hendrick, S. (2013) Understanding the role of sulfur-thiamine interaction in the pathogenesis of sulfur-induced polioencephalomalacia in beef cattle. *Res. Vet. Sci.* 95, 1081–7.

(27) Di Costanzo, A., Spain, J. N., and Spiers, D. E. (1997) Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. *J. Dairy Sci.* 80, 1200–6.

(28) Tang, J., Wen, Z. G., Guo, Z. B., Huang, W., Guo, Y. M., Xie, M., and Hou, S. S. (2014) Dietary riboflavin supplementation improve the growth performance and antioxidant status of starter white Pekin ducks fed a corn–soybean meal diets. *Livest. Sci.* 170, 131–136.

(29) Chaiyotwittayakun, A., Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Herd, T. H., Sears, P. M., and Harmont, R. J. (2002) The effect of ascorbic acid and L-histidine therapy on acute mammary inflammation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 60–7.

(30) Cortinhas, C. S., Botaro, B. G., Sucupira, M. C. A., Renno, F. P., and Santos, M. V. (2010) Antioxidant enzymes and somatic cell count in dairy cows fed with organic source of zinc, copper and selenium. *Livest. Sci.* 127, 84–87.

(31) Pal, D. T., Gowda, N. K. S., Prasad, C. S., Amarnath, R., Bharadwaj, U., Suresh Babu, G., and Sampath, K. T. (2010) Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24, 89–94.

(32) Sinclair, L. A., Hart, K. J., Johnson, D., and Mackenzie, A. M. (2013) Effect of inorganic or organic copper fed without or with added sulfur and molybdenum on the performance, indicators of copper status, and hepatic mRNA in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 4355–67.

(33) Machado, V. S., Oikonomou, G., Lima, S. F., Bicalho, M. L. S., Kacar, C., Foditsch, C., Felipe, M. J., Gilbert, R. O., and Bicalho, R. C. (2014) The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. *Vet. J.* 200, 299–304.

(34) Griffiths, L. M., Loeffler, S. H., Socha, M. T., Tomlinson, D. J., and Johnson, A. B. (2007) Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 69–83.

(35) Hansen, S. L., Ashwell, M. S., Moeser, A. J., Fry, R. S., Knutson, M. D., and Spears, J. W. (2010) High dietary iron reduces transporters involved in iron and manganese metabolism and increases intestinal permeability in calves. *J. Dairy Sci.* 93, 656–65.

(36) Swecker, W. S. (2014) Trace Mineral Feeding and Assessment. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 30, 671–688.

- (37) Abba, M., De Luca, J. ., Mattioli, G., Zaccardi, E., and Dulout, F. . (2000) Clastogenic effect of copper deficiency in cattle. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 466, 51–55.
- (38) Vignola, G., Lambertini, L., Mazzone, G., Giammarco, M., Tassinari, M., Martelli, G., and Bertin, G. (2009) Effects of selenium source and level of supplementation on the performance and meat quality of lambs. *Meat Sci.* 81, 678–685.
- (39) Cope, C. M., Mackenzie, A. M., Wilde, D., and Sinclair, L. A. (2009) Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *J. Dairy Sci.* 92, 2128–35.
- (40) Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C. M., and Nolla, J. (2008) Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13, 245–251.
- (41) McClements, D. J. (2011) Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 7, 2297–2316.
- (42) Wilson, N., and Shah, N. P. (2007) Microencapsulation of vitamins. *Int. Food Res. J.* 14, 1–14.
- (43) Reineccius Gary, A., Ward Florian, M., Whorton, C., and Andon Steve, A. (1995) Developments in Gum Acacias for the Encapsulation of Flavors. *Encapsulation Control. Release Food Ingredients* 590, 161–168.
- (44) Gonnet, M., Lethuaut, L., and Boury, F. (2010) New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control. Release* 146, 276–290.
- (45) Desai, K. G., and Park, H. J. (2006) Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *J. Microencapsul.* 23, 91–103.
- (46) Zirak, M. B., and Pezeshki, A. (2015) Effect of Surfactant Concentration on the Particle Size , Stability and Potential Zeta of Beta carotene Nano Lipid Carrier 4, 924–932.
- (47) Saberi, A. H., Fang, Y., and McClements, D. J. (2013) Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* 391, 95–102.
- (48) Yang, Y., and McClements, D. J. (2013) Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocoll.* 30, 712–720.
- (49) Jaworska, M. A., Sikora, E. S., and Ogonowski, J. (2013) Microemulsions Based on Propylene Glycol Diesters of Caprylic and Capric Acids. *Polish J. Chem. Technol.* 15, 68–73.
- (50) Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., and Sparreboom, A. (2001) Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* 37, 1590–8.
- (51) Webster, L. K., Cosson, E. J., Stokes, K. H., and Millward, M. J. (1996) Effect of the paclitaxel vehicle, Cremophor EL, on the pharmacokinetics of doxorubicin and doxorubicinol in mice. *Br. J. Cancer* 73, 522–4.
- (52) Pan, X., Yao, P., and Jiang, M. (2007) Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and beta-carotene. *J. Colloid Interface Sci.* 315, 456–63.
- (53) Zuccari, G., Carosio, R., Fini, A., Montaldo, P. G., and Orienti, I. (2005) Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. *J. Control. Release* 103, 369–380.
- (54) Desai, K. G. H., and Jin Park, H. (2005) Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Dry. Technol.* 23, 1361–1394.
- (55) WAGNER, L. A., and WARTHESEN, J. J. (1995) Stability of Spray-Dried Encapsulated Carrot Carotenes. *J. Food Sci.* 60, 1048–1053.
- (56) Junyaprasert, V. B., Mitrevej, A., Sinchaipanid, N., Boonme, P., and Wurster, D. E. (2001) Effect of Process Variables on the Microencapsulation of Vitamin A Palmitate by Gelatin-Acacia Coacervation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 561–566.
- (57) Petritz, E., Tritthart, T., and Wintersteiger, R. (2006) Determination of phylloquinone and cholecalciferol encapsulated in granulates formed by melt extrusion. *J. Biochem. Biophys. Methods* 69, 101–112.
- (58) Lin, H. S., Chean, C. S., Ng, Y. Y., Chan, S. Y., and Ho, P. C. (2000) 2-Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Increases Aqueous Solubility and Photostability of All-Trans-Retinoic Acid. *J. Clin. Pharm.*

Ther. 25, 265–9.

- (59) Montassier, P., Duchêne, D., and Poelman, M. C. (1997) Inclusion complexes of tretinoin with cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 153, 199–209.
- (60) Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., and Saurel, R. (2007) Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107–1121.
- (61) Ali, B. H., Ziada, A., and Blunden, G. (2009) Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1–8.
- (62) Randall, R. C., Phillips, G. O., and Williams, P. A. (1989) Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocoll.* 3, 65–75.
- (63) McClements, D. J., and Rao, J. (2011) Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 285–330.
- (64) Wooster, T. J., Golding, M., and Sanguansri, P. (2008) Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir* 24, 12758–65.
- (65) Ferguson, T. I., Emery, S., Price-Davies, R., and Cosslett, A. G. (2014) A review of stability issues associated with vitamins in parenteral nutrition. *ESPEN. J.* 9, 49–53.
- (66) Chen, M. F., Boyce, H. W., and Triplett, L. (1993) Stability of the B vitamins in mixed parenteral nutrition solution. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* 7, 462–4.
- (67) Shurson, G. C., Salzer, T. M., Koehler, D. D., and Whitney, M. H. (2011) Effect of metal specific amino acid complexes and inorganic trace minerals on vitamin stability in premixes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 163, 200–206.
- (68) Allwood, M. C., and Martin, H. J. (2000) The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion. *Clin. Nutr.* 19, 339–42.
- (69) Sabliov, C. M., Fronczek, C., Astete, C. E., Khachatryan, M., Khachatryan, L., and Leonardi, C. (2009) Effects of Temperature and UV Light on Degradation of Tocopherol in Free and Dissolved Form. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 895–902.
- (70) Hemery, Y. M., Fontan, L., Moench-Pfanner, R., Laillou, A., Berger, J., Renaud, C., and Avallone, S. (2015) Influence of light exposure and oxidative status on the stability of vitamins A and D₃ during the storage of fortified soybean oil. *Food Chem.* 184, 90–8.
- (71) Crank, G., and Pardijanto, M. S. (1995) Photo-oxidations and photosensitized oxidations of vitamin A and its palmitate ester. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 85, 93–100.
- (72) Puysuwan, L., Chavasit, V., Sungpuag, P., Hediger, D., and Punvichai, T. (2007) Feasibility and use of vitamin A-fortified vegetable oils among consumers of different socioeconomic status in Thailand. *Food Nutr. Bull.* 28, 181–188.
- (73) Kalaras, M. D., Beelman, R. B., Holick, M. F., and Elias, R. J. (2012) Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Chem.* 135, 396–401.
- (74) King, J., and Min, D. (2002) Riboflavin-photosensitized singlet oxygen oxidation product of vitamin D₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 983–987.
- (75) Bae, E. K., and Lee, S. J. (2008) Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *J. Microencapsul.* 25, 549–560.
- (76) Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., and Hubinger, M. D. (2013) Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J. Food Eng.* 115, 443–451.
- (77) Bule, M. V., Singhal, R. S., and Kennedy, J. F. (2010) Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improved stability. *Carbohydr. Polym.* 82, 1290–1296.
- (78) Allwood, M. C., and Kearney, M. C. (1998) Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. *Nutrition* 14, 697–706.
- (79) Gibbons, E., Allwood, M. C., Neal, T., and Hardy, G. (2001) Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, 605–611.

- (80) Boatright, W. L. (2015) Oxygen dependency of one-electron reactions generating ascorbate radicals and hydrogen peroxide from ascorbic acid. *Food Chem.* 196, 1361–1367.
- (81) Ahmad, I., Hafeez, A., Akhter, N., H. M. Vaid, F., and Qadeer, K. (2012) Effect of Riboflavin on the Photolysis of Cyanocobolamin in Aqueous Solution. *Open Anal. Chem. J.* 6, 22–27.
- (82) Jamil Akhtar, M., Ataullah Khan, M., and Ahmad, I. (2000) Effect of riboflavin on the photolysis of folic acid in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 1039–1044.
- (83) Monajjemzadeh, F., Ebrahimi, F., Zakeri-Milani, P., and Valizadeh, H. (2014) Effects of formulation variables and storage conditions on light protected vitamin B12 mixed parenteral formulations. *Adv. Pharm. Bull.* 4, 329–38.
- (84) Ribeiro, D. O., Pinto, D. C., Lima, L. M. T. R., Volpato, N. M., Cabral, L. M., and de Sousa, V. P. (2011) Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. *Nutr. J.* 10, 1–9.
- (85) Araújo, M. M., Marchioni, E., Bergaentzle, M., Zhao, M., Kuntz, F., Hahn, E., and Villavicencio, A. L. C. H. (2011) Irradiation stability of folic acid in powder and aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1244–1248.
- (86) Gazzali, A. M., Lobry, M., Colombeau, L., Acherar, S., Azaïs, H., Mordon, S., Arnoux, P., Baros, F., Vanderesse, R., and Frochot, C. (2016) Stability of folic acid under several parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* 93, 419–430.
- (87) Jamil Akhtar, M., Ataullah Khan, M., and Ahmad, I. (2003) Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 579–588.
- (88) Coelho, M., and Ph, D. (1991) Vitamin Stability in Premixes and Feeds A Practical Approach in Ruminant Diets. *Proc. 13th Annu. Florida Rumin. Nutr. Symp.* 1, 127–145.
- (89) Czaplicki, S. (2013) Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatogr.* 1, 1–12.
- (90) Dionex. (2010) Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Nutritional Supplements by HPLC with UV Detection. *Thermo Sci.* 1–10.
- (91) Taylor, P., and Chronakis, I. S. (2010) On the Molecular Characteristics , Compositional Properties , and Structural-Functional Mechanisms of Maltodextrins□: A Review On the Molecular Characteristics , Compositional Properties , and Structural- Fun. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37–41.
- (92) Idris, O. H. M., Williams, P. A., and Phillips, G. O. (1998) Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. *Food Hydrocoll.* 12, 379–388.
- (93) Lopez-Torrez, L., Nigen, M., Williams, P., Doco, T., and Sanchez, C. (2015) Acacia senegal vs. Acacia seyal gums - Part 1: Composition and structure of hyperbranched plant exudates. *Food Hydrocoll.* 51, 41–53.
- (94) Nie, S. P., Wang, C., Cui, S. W., Wang, Q., Xie, M. Y., and Phillips, G. O. (2013) A further amendment to the classical core structure of gum arabic (Acacia senegal). *Food Hydrocoll.* 31, 42–48.
- (95) Suresh, S., Gunasekaran, S., and Srinivasan, S. (2015) Vibrational spectra (FT-IR, FT-Raman), frontier molecular orbital, first hyperpolarizability, NBO analysis and thermodynamics properties of Piroxicam by HF and DFT methods. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 138, 447–459.
- (96) Sacithraa, R., Madhan, M. ., and Vijayachitra.S. (2013) Quantitative Analysis of Tapioca Starch using FT-IR Spectroscopy and Partial Least Squares. *Int. J. Comput. Appl.* 29–33.
- (97) Huang, C. ., Jeng, R., Sain, M., Saville, B. a., and Hubbes, M. (2006) Production, characterization, and mechanical properties of starch modified by ophiostoma spp. *Bioresources* 1, 257–269.
- (98) Wang, L., Gao, Y., Li, J., Subirade, M., Song, Y., and Liang, L. (2016) Effect of resveratrol or ascorbic acid on the stability of□??-tocopherol in O/W emulsions stabilized by whey protein isolate: Simultaneous encapsulation of the vitamin and the protective antioxidant. *Food Chem.* 196, 466–474.
- (99) Pettine, M., Gennari, F., and Campanella, L. (2013) The reaction of selenium (IV) with ascorbic acid: Its relevance in aqueous and soil systems. *Chemosphere* 90, 245–250.
- (100) Shaker, A. M. (1996) Kinetics of the Reduction of Se(IV) to Se-Sol. *J. Colloid Interface Sci.* 180, 225–

- (101) Chen, Y. W., Truong, H. Y. T., and Belzile, N. (2009) Abiotic formation of elemental selenium and role of iron oxide surfaces. *Chemosphere* 74, 1079–1084.
- (102) Gosavi, S. R., Deshpande, N. G., Gudage, Y. G., and Sharma, R. (2008) Physical, optical and electrical properties of copper selenide (CuSe) thin films deposited by solution growth technique at room temperature. *J. Alloys Compd.* 448, 344–348.
- (103) Chen, X., Li, Z., Yang, J., Sun, Q., and Dou, S. (2015) Aqueous preparation of surfactant-free copper selenide nanowires. *J. Colloid Interface Sci.* 442, 140–146.
- (104) Ferguson, T. I., Emery, S., Price-Davies, R., and Cosslett, A. G. (2014) A review of stability issues associated with vitamins in parenteral nutrition. *ESPEN. J.* 9, e49–e53.
- (105) Koliou, E. K., and Ioannou, P. V. (2005) Preparation of dehydro-L-ascorbic acid dimer by air oxidation of L-ascorbic acid in the presence of catalytic amounts of copper(II) acetate and pyridine. *Carbohydr. Res.* 340, 315–318.
- (106) Dupertuis, Y. M., Ramseyer, S., Fathi, M., and Pichard, C. (2005) Assessment of ascorbic acid stability in different multilayered parenteral nutrition bags: critical influence of the bag wall material. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 29, 125–130.
- (107) DSM. (2002) Vitamin Stability During Processing and Storage. *Food Technol.* 25–28.
- (108) Kendric C. Smith. (2009) Basic photochemistry. *Radiat. Biol.* 1, 1–8.
- (109) Hall, N. K., Chapman, T. M., Kim, H. J., and Min, D. B. (2010) Antioxidant mechanisms of Trolox and ascorbic acid on the oxidation of riboflavin in milk under light. *Food Chem.* 118, 534–539.
- (110) Astanov, S., Sharipov, M. Z., Fayzullaev, A. R., Kurtaliev, E. N., and Nizomov, N. (2014) Spectroscopic study of photo and thermal destruction of riboflavin. *J. Mol. Struct.* 1071, 133–138.
- (111) Huang, R., Choe, E., and Min, D. b. (2004) Kinetics for Singlet Oxygen Formation by Riboflavin Photosensitization and the Reaction between Riboflavin and Singlet Oxygen. *J. Food Sci.* 69, C726–C732.
- (112) Mahendran, T., Williams, P. a, Phillips, G. O., Al-Assaf, S., and Baldwin, T. C. (2008) New insights into the structural characteristics of the arabinogalactan - Protein (AGP) fraction of gum Arabic. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9269–9276.
- (113) Boiero, M. L., Mandrioli, M., Vanden Braber, N., Rodriguez-Estrada, M. T., García, N. A., Borsarelli, C. D., and Montenegro, M. A. (2014) Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk. *J. Dairy Sci.* 97, 5328–5336.
- (114) Baumgartner, T. G., Henderson, G. N., Fox, J., and Gondi, U. (1997) Stability of ranitidine and thiamine in parenteral nutrition solutions. *Nutrition* 13, 547–553.

Capítulo 7 – Anexos

Anexo I- Cromatogramas dos padrões das vitaminas hidrossolúveis

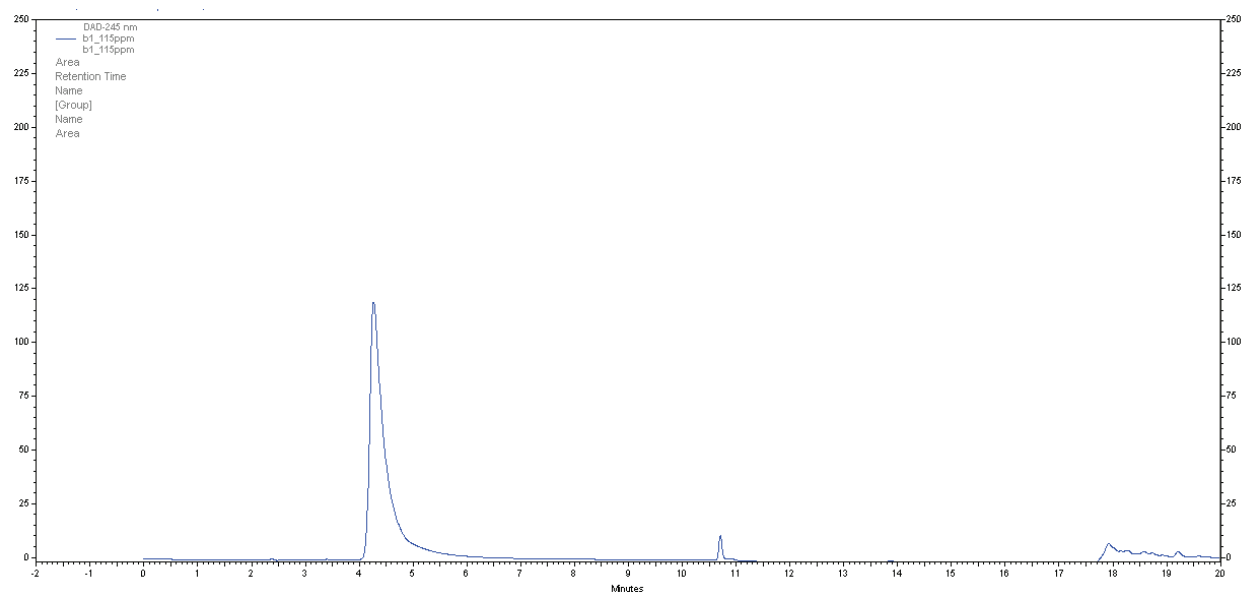


Figura 20- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B1. □=245 nm

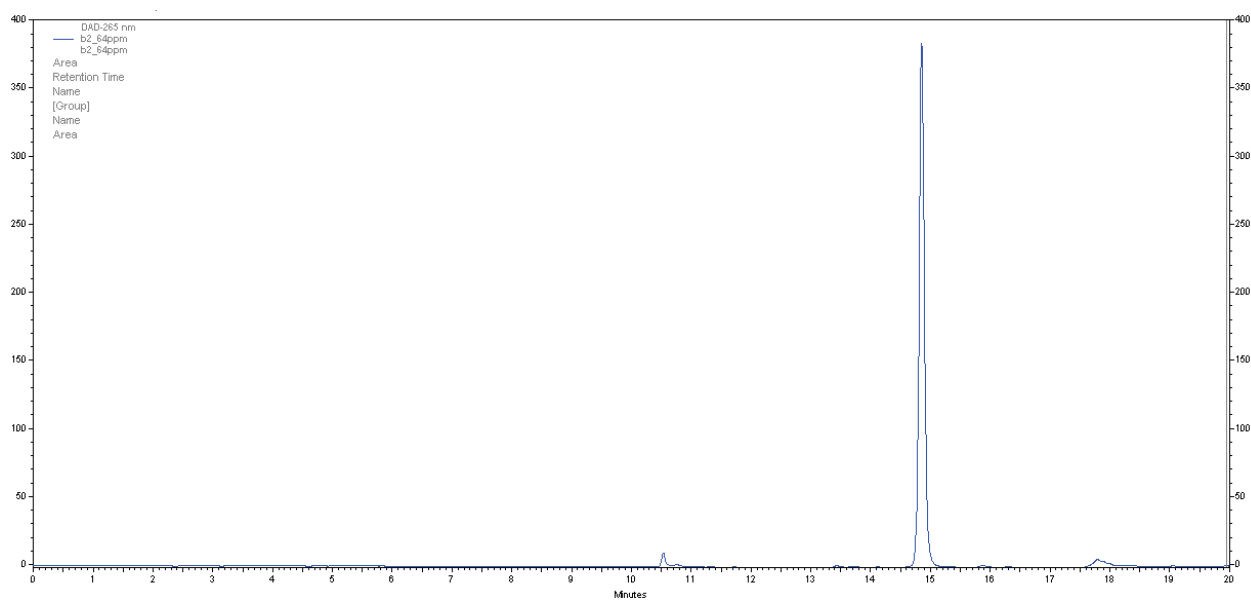


Figura 21- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B2. □=265 nm

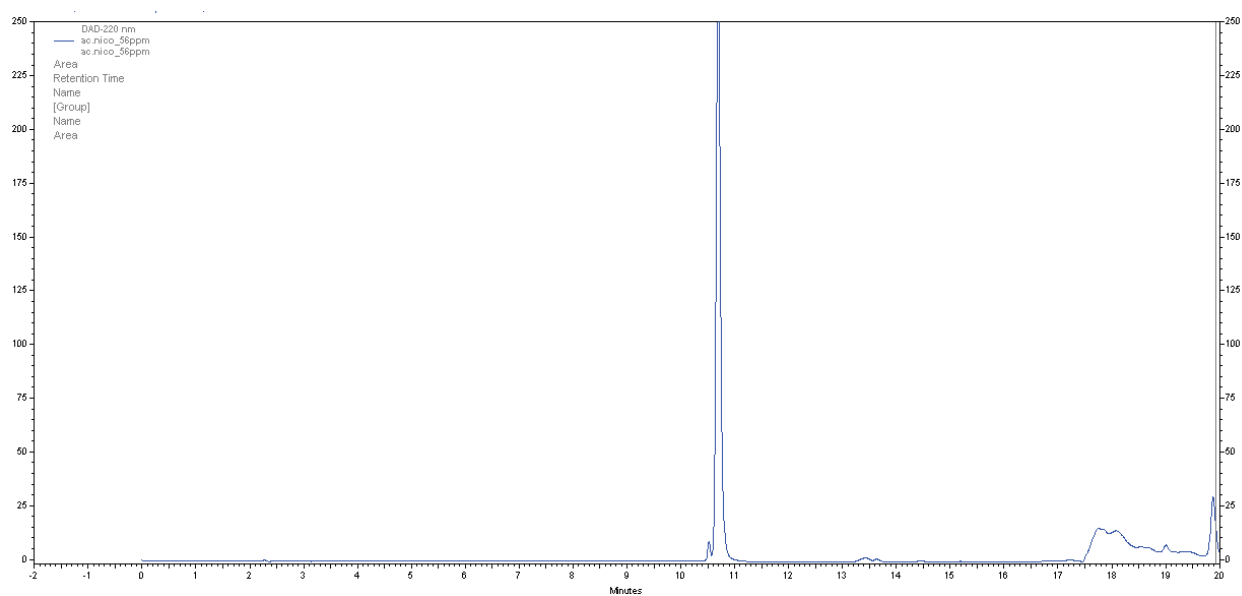


Figura 22- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B3. □=220 nm

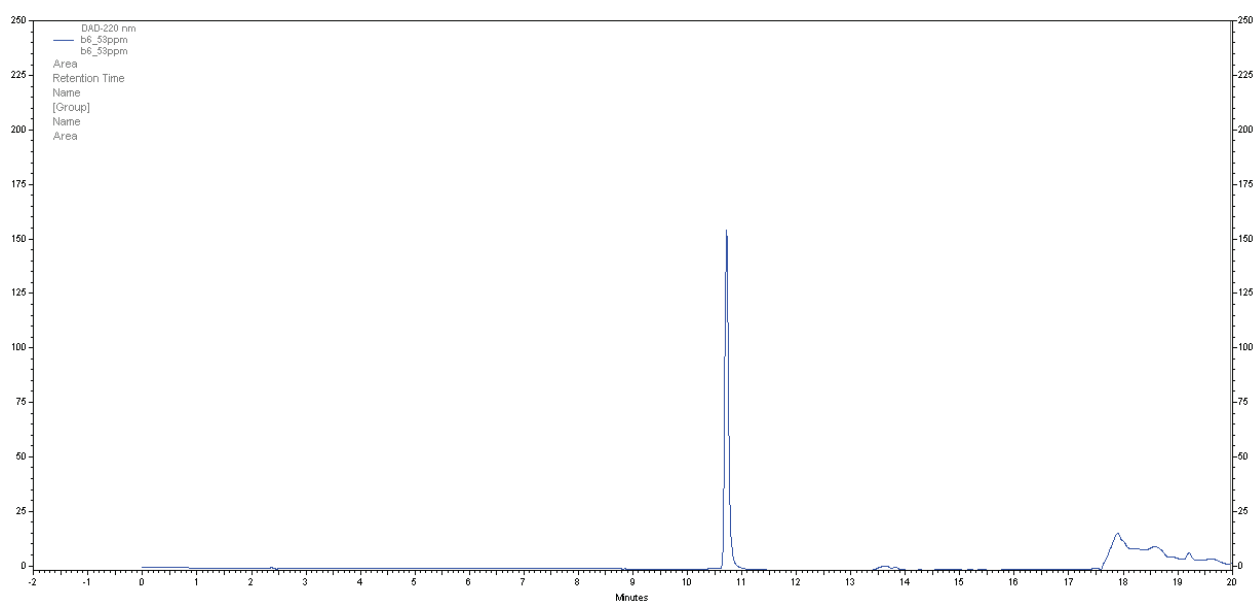


Figura 23- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B6. □=220 nm

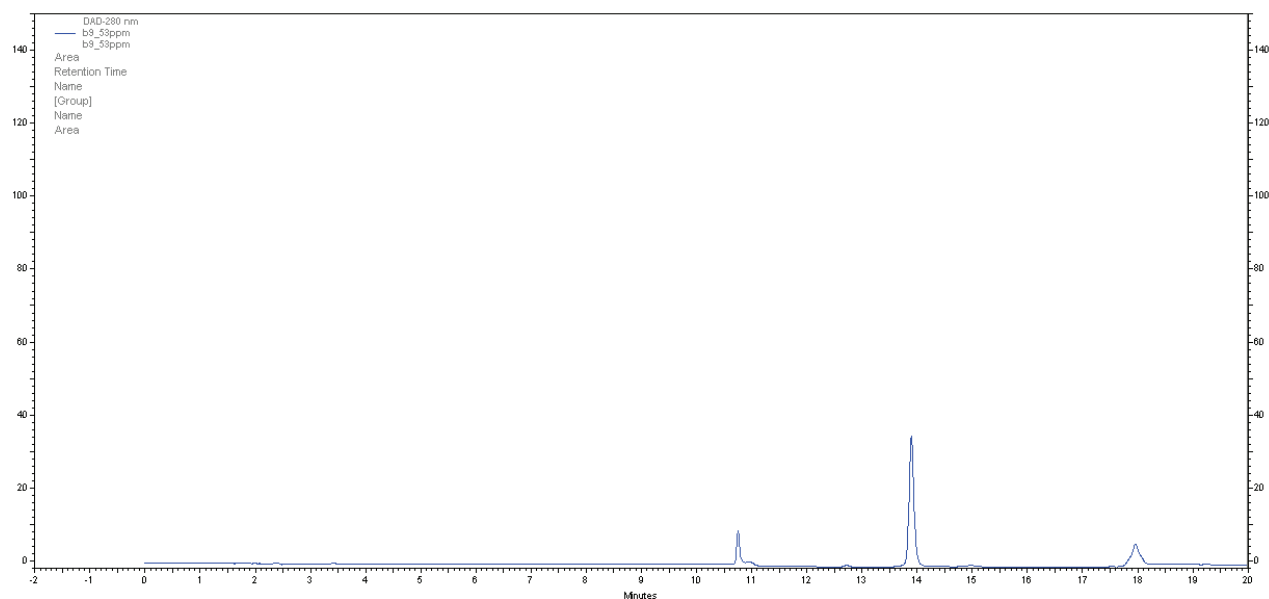


Figura 24- Cromatograma representativo do padrão da vitamina B6. □=280 nm

Anexo II- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em t=0

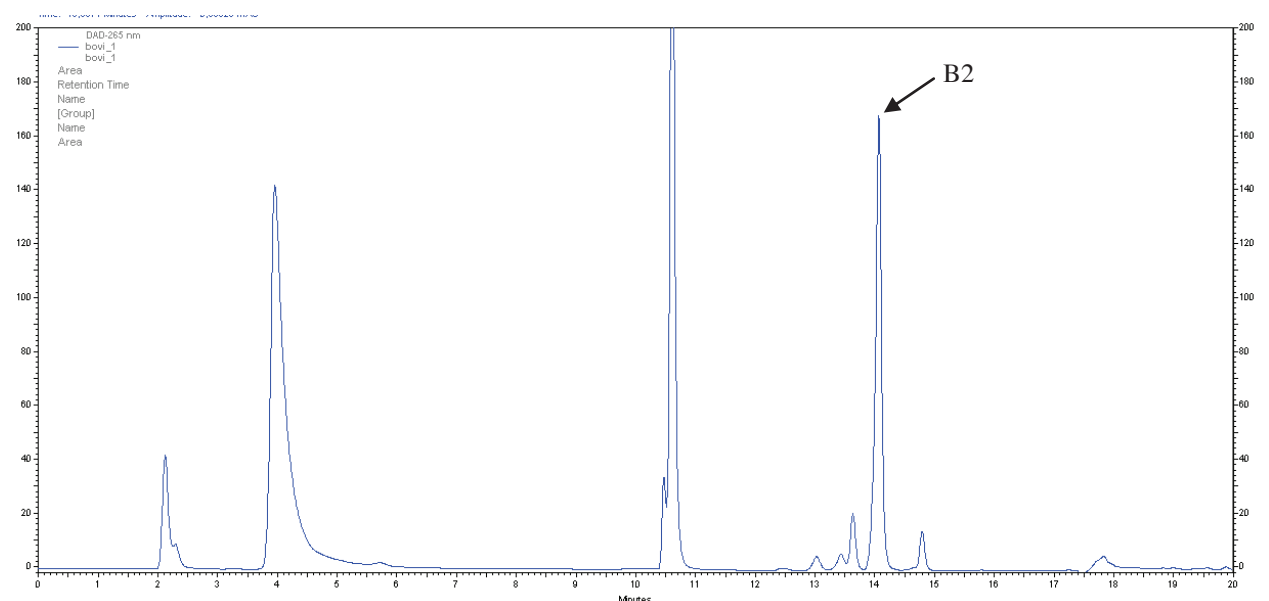


Figura 25 - Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.

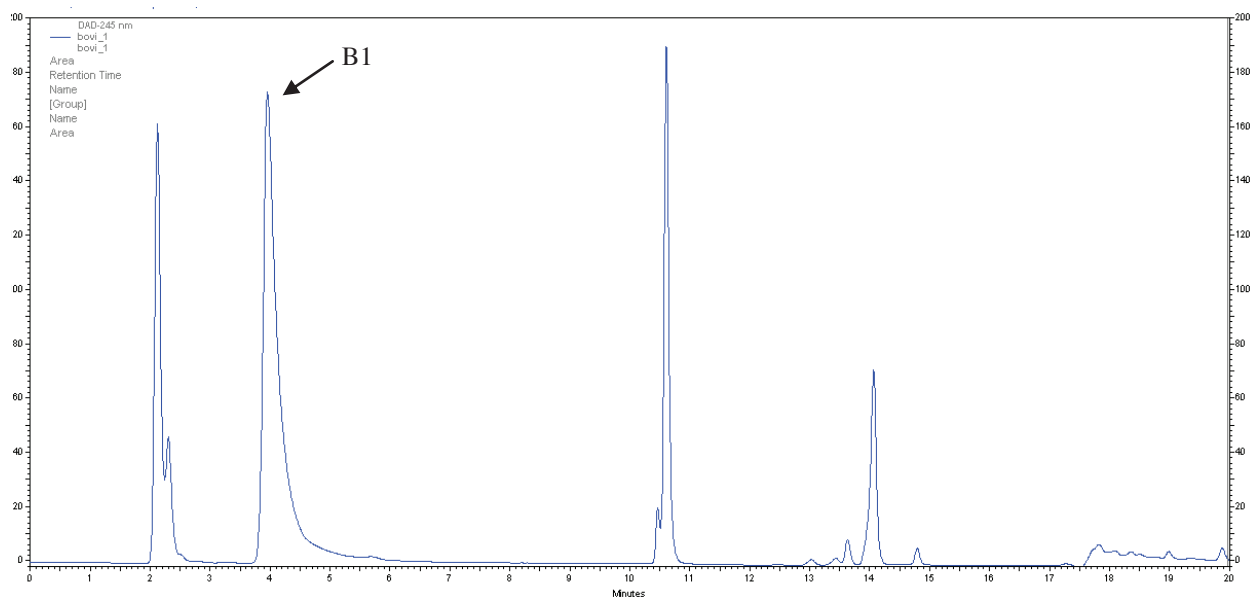


Figura 26- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm.

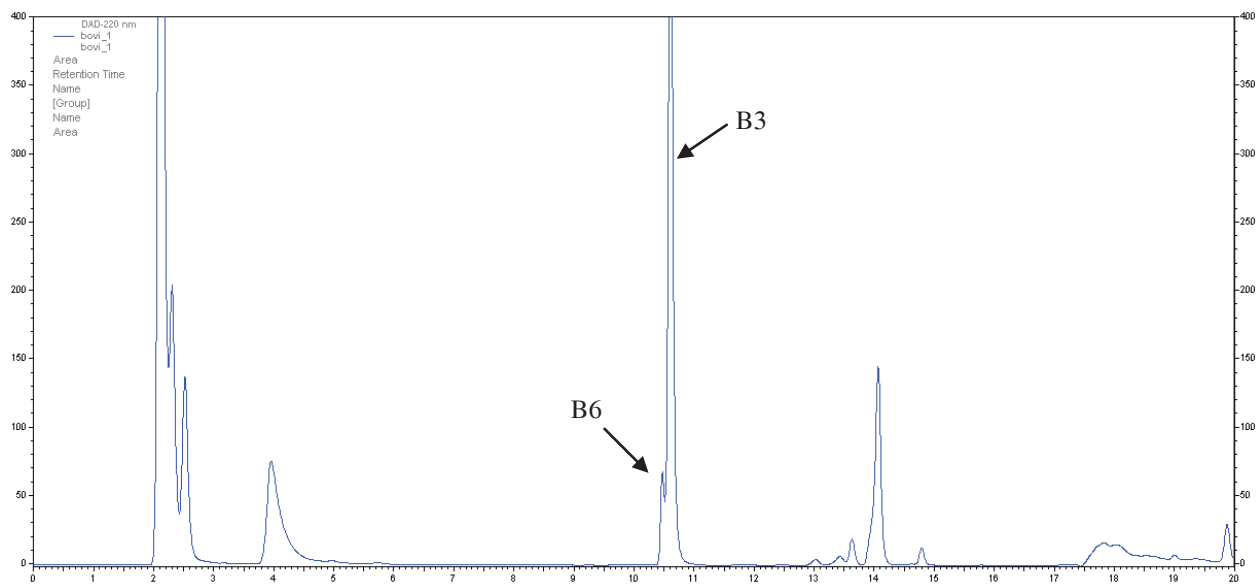


Figura 27- - Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.

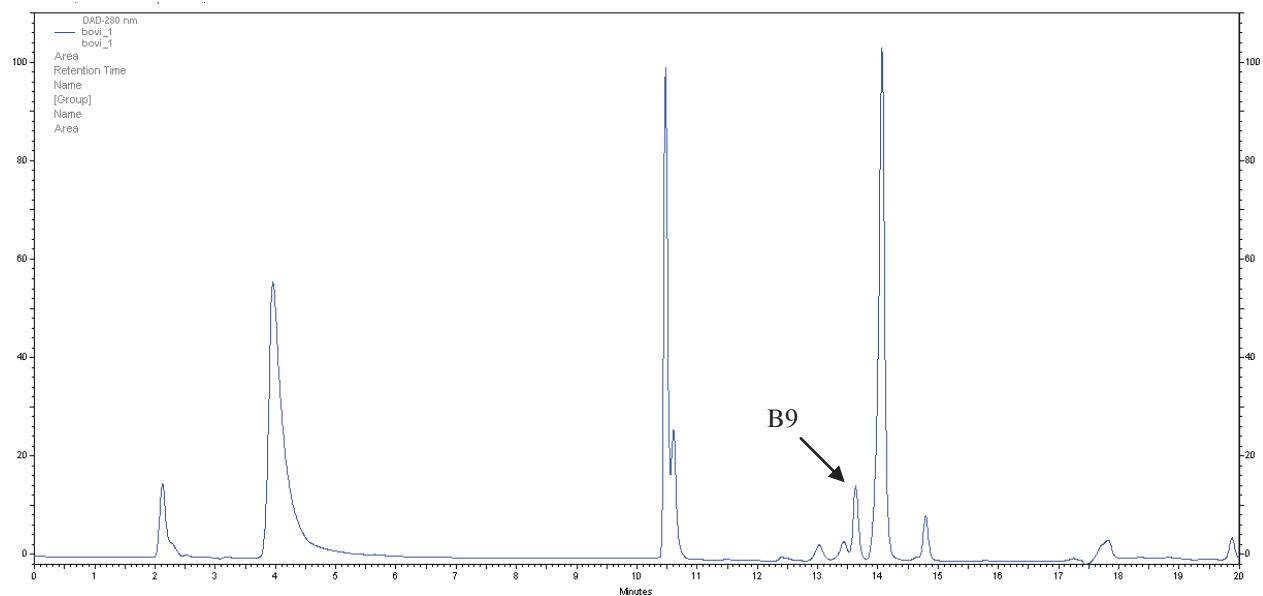


Figura 28- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.

Anexo III- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=1

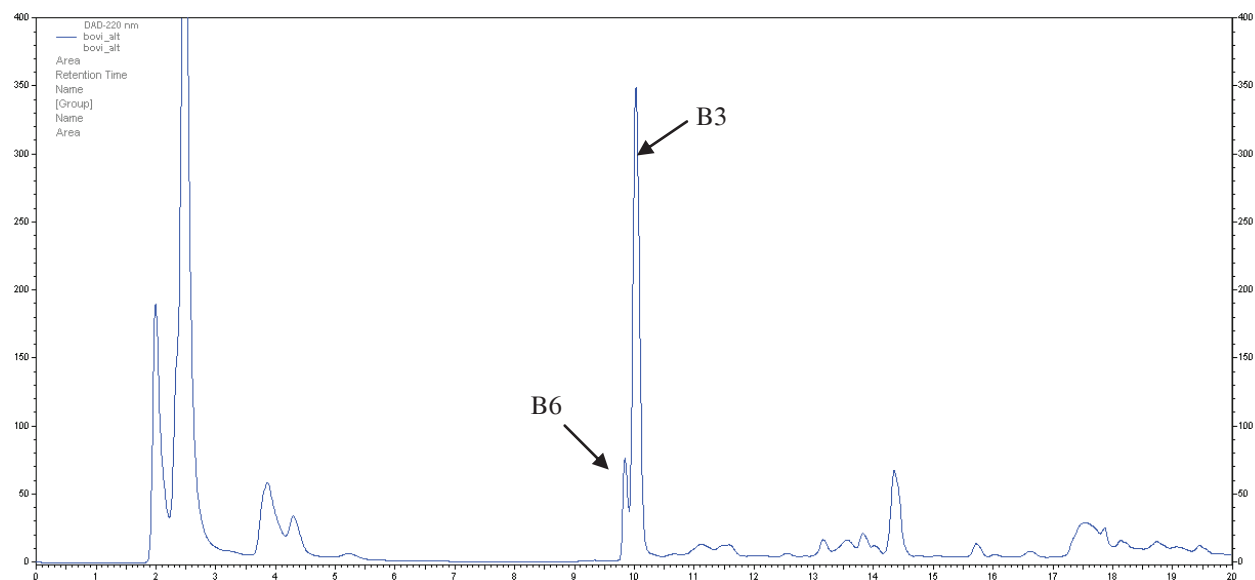


Figura 29- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.

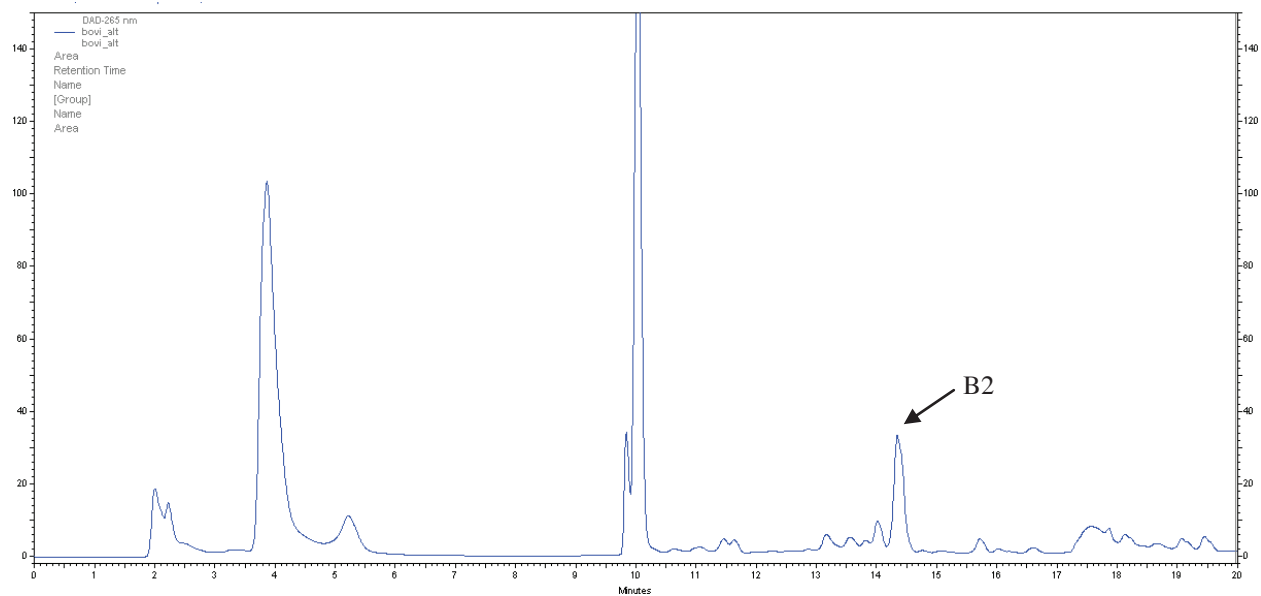


Figura 30- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.

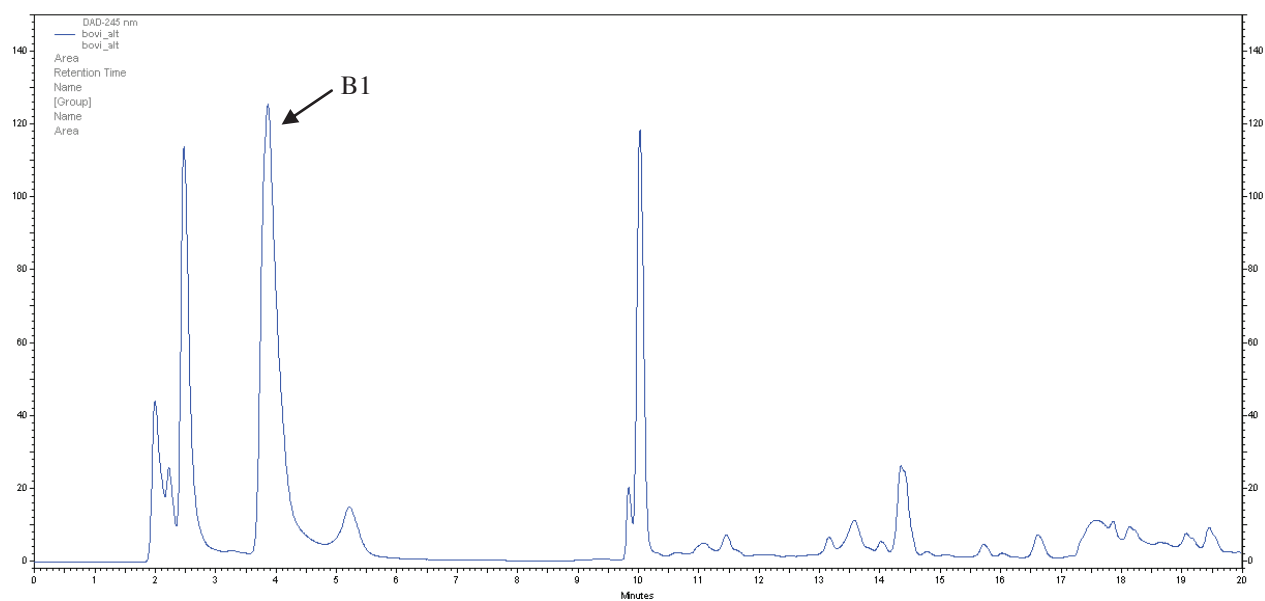


Figura 31- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm

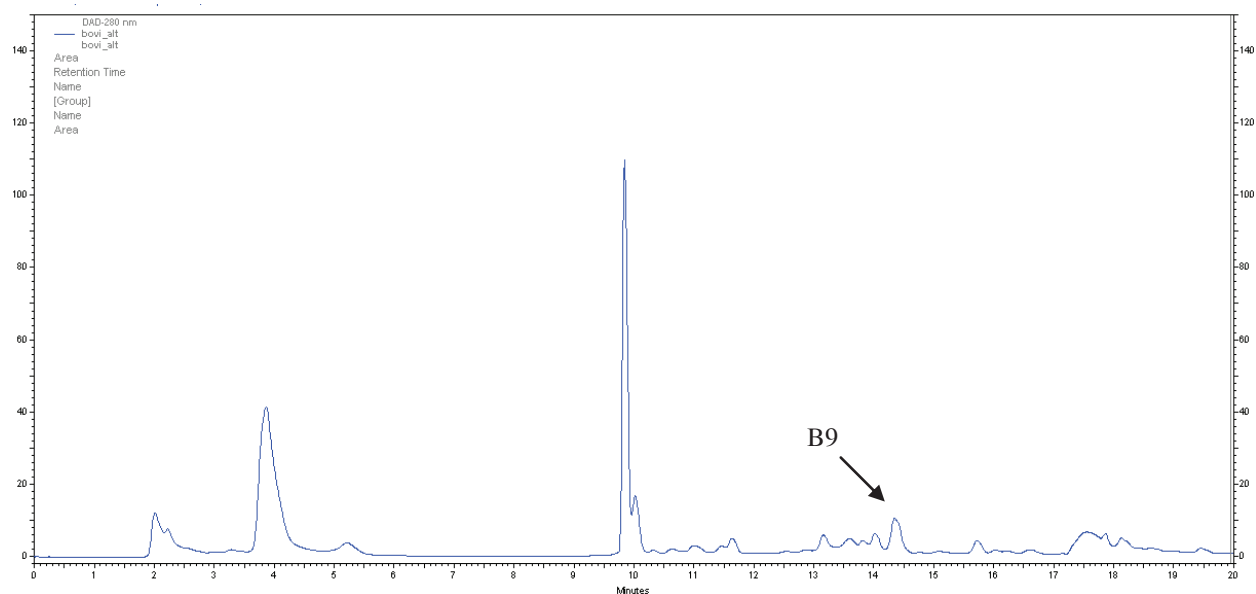


Figura 32- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.

Anexo IV- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=2

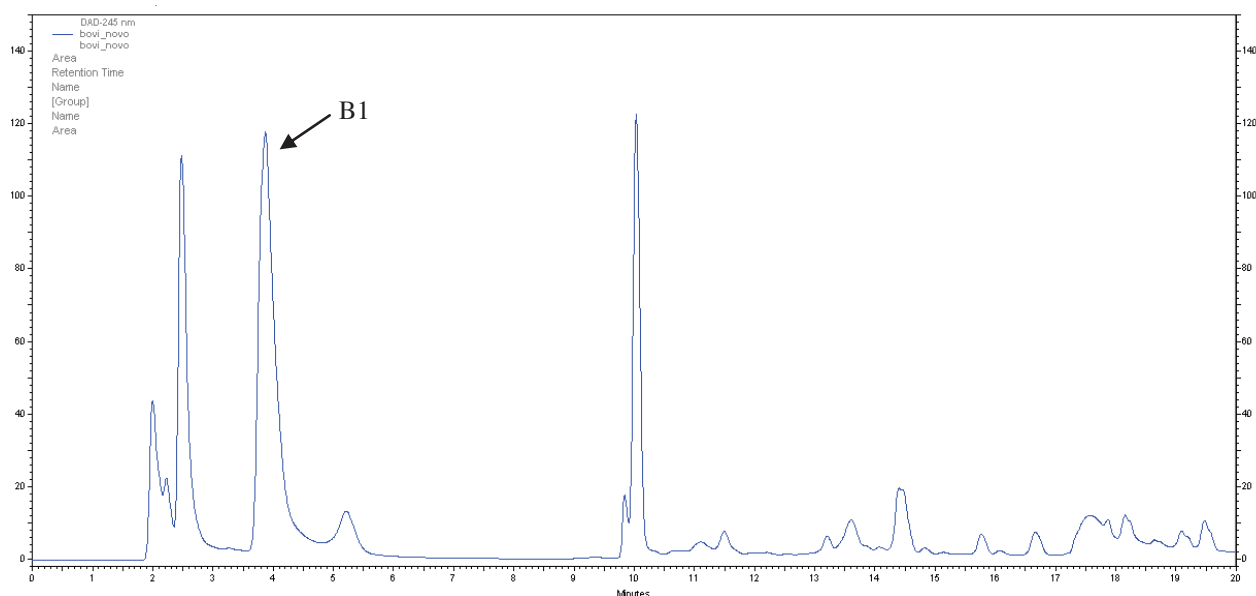


Figura 33- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm

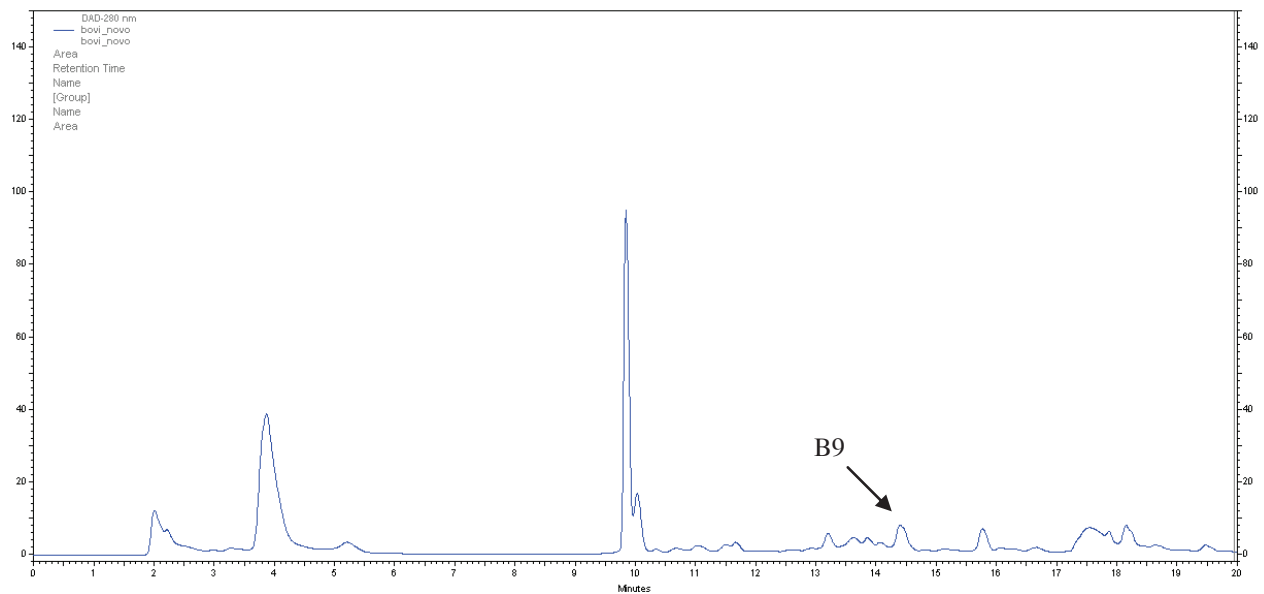


Figura 34- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitaminas e minerais. λ =280 nm.

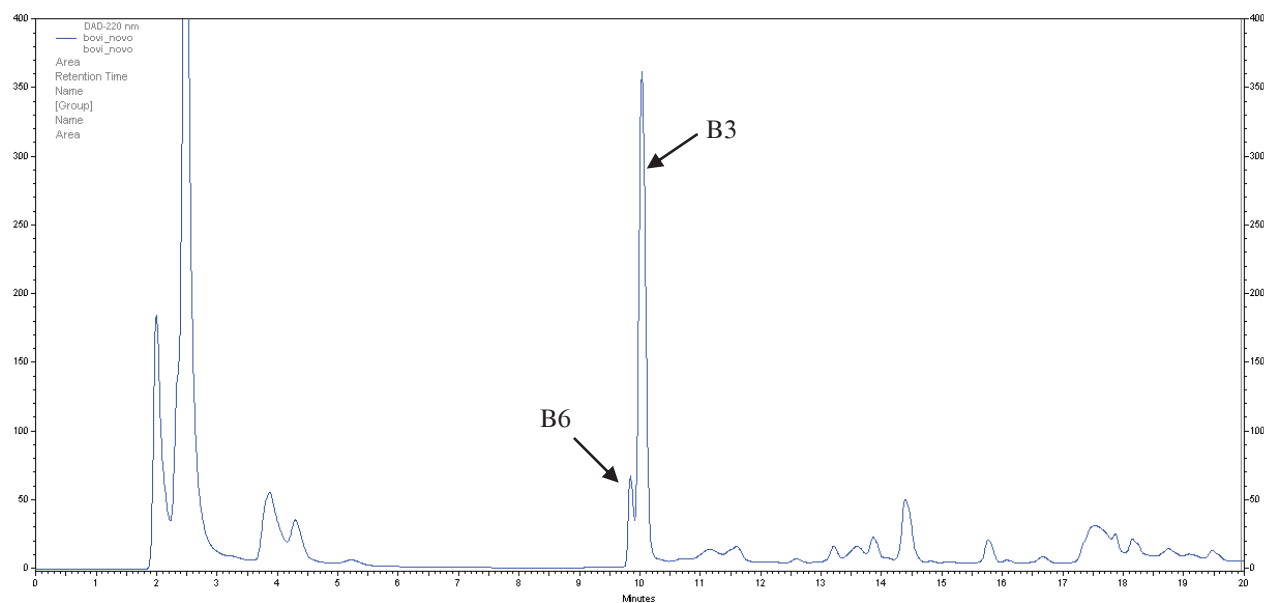


Figura 35 - Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitaminas e minerais. λ =220 nm.

Anexo V- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=3

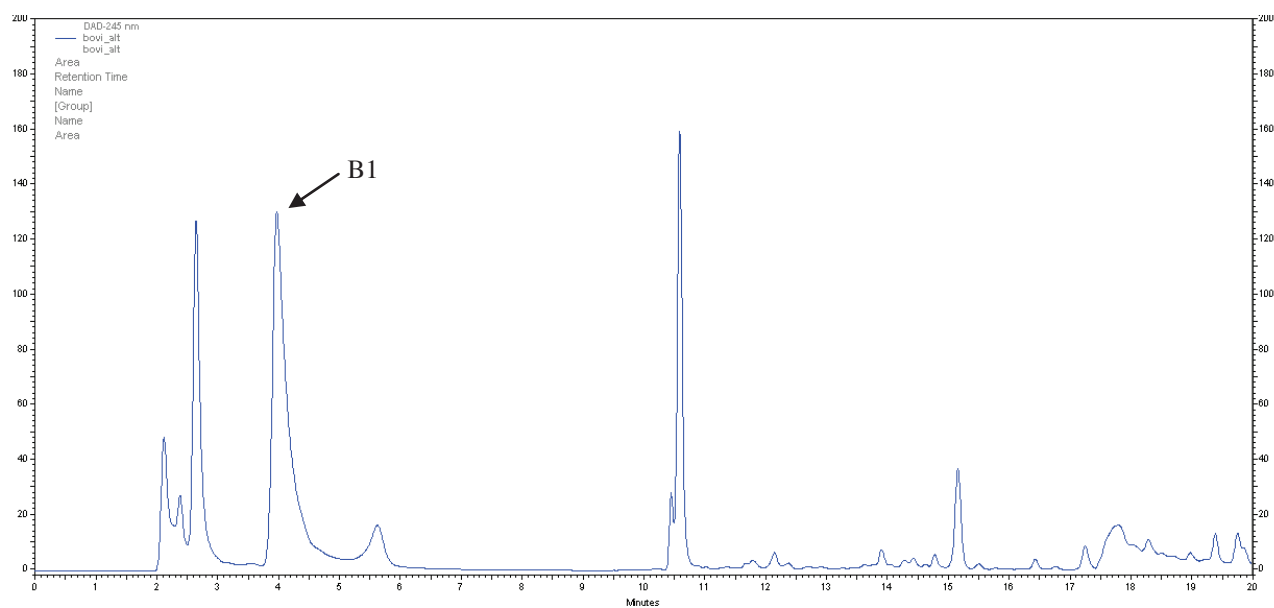


Figura 36- Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=245 nm

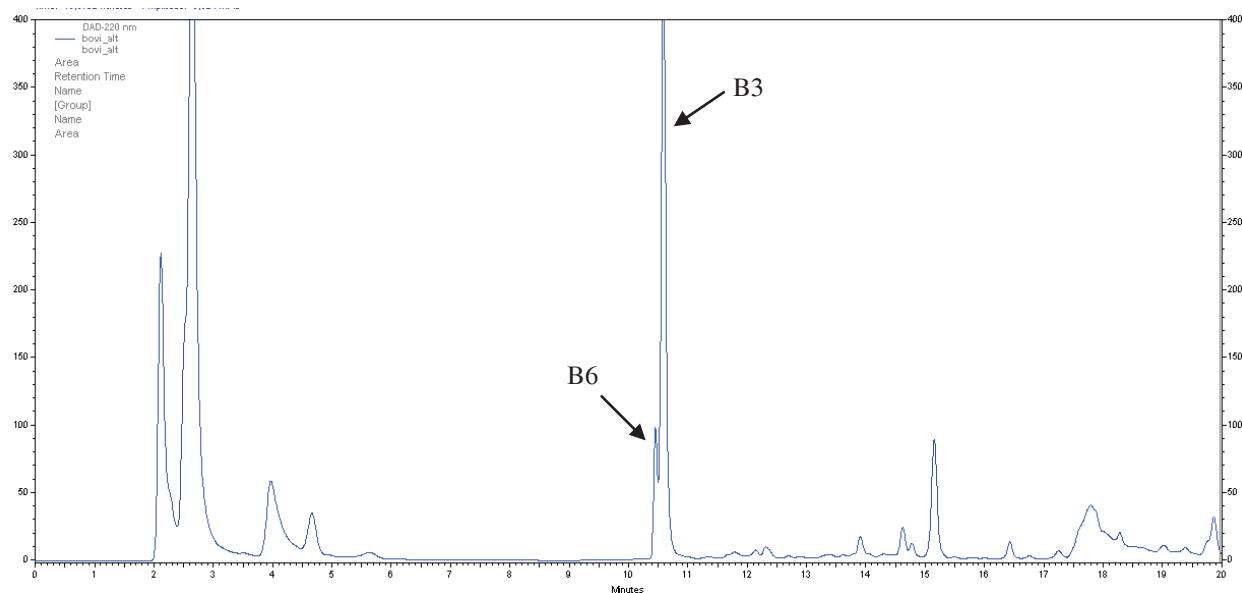


Figura 37- Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=220 nm.

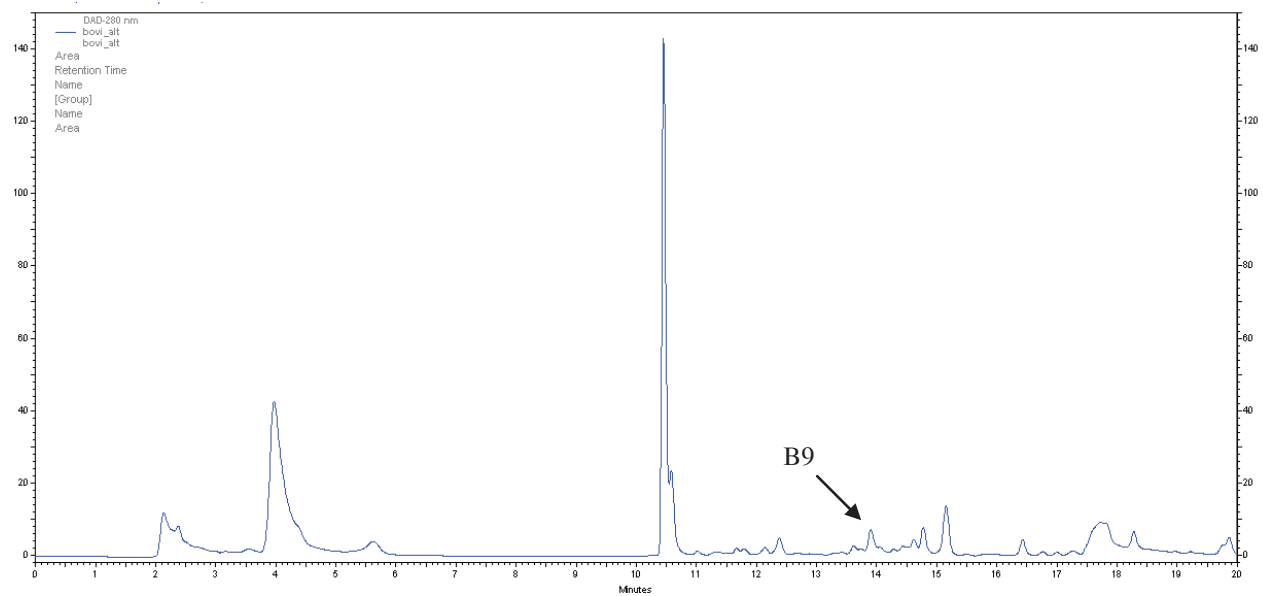


Figura 38 - Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=280 nm.

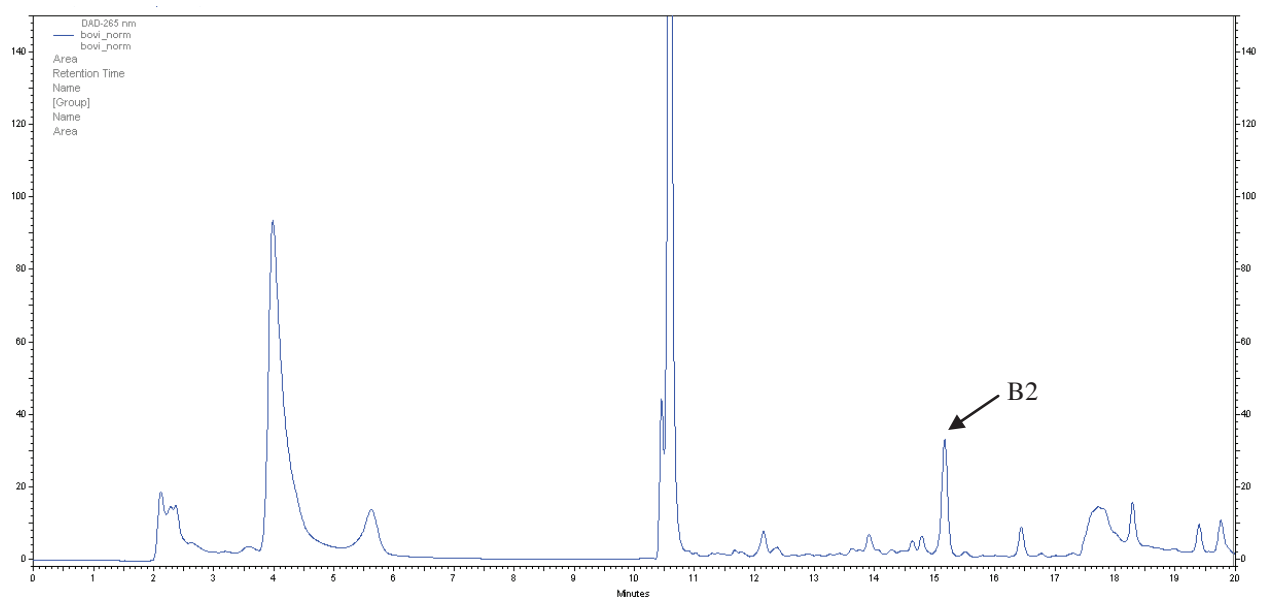


Figura 39 - Cromatograma obtido na análise T=3 do suplemento com vitaminas e minerais. □=265 nm.

Anexo VI- Cromatogramas da análise do suplemento vitamínico e mineral em T=4

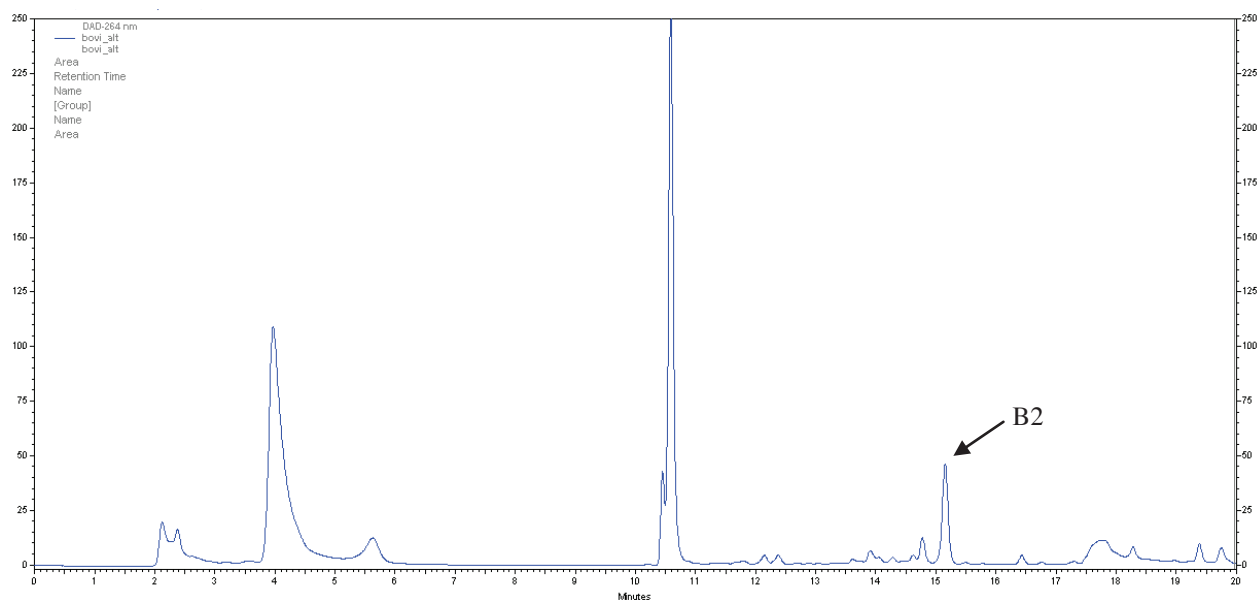


Figura 40 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. λ =265 nm.

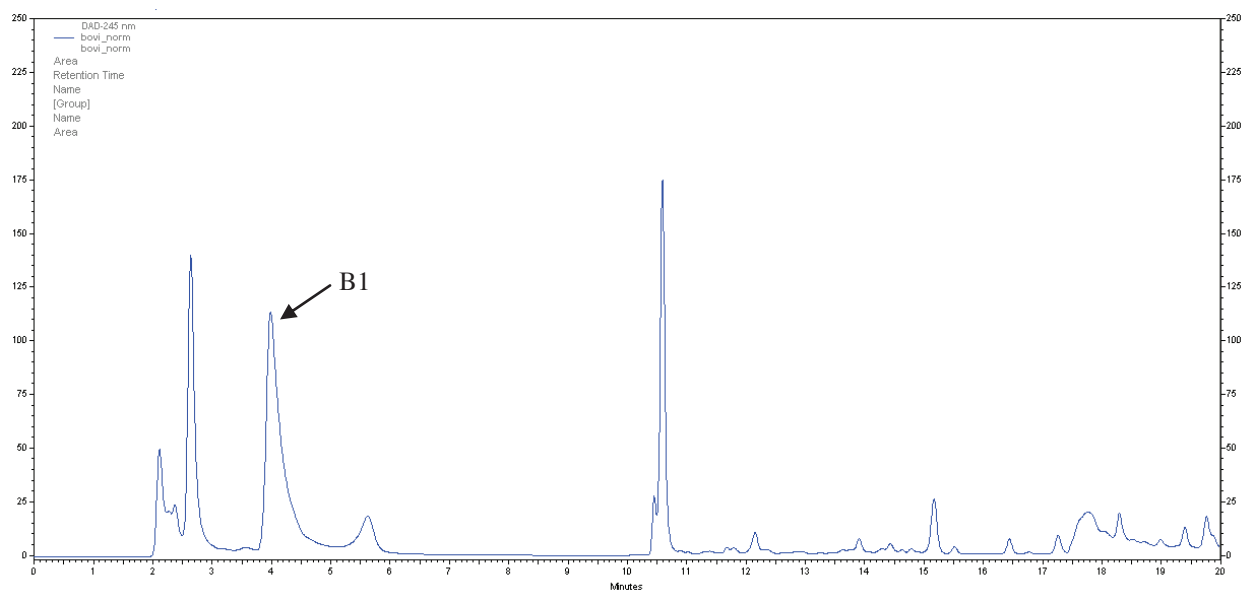


Figura 41 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. λ =245 nm

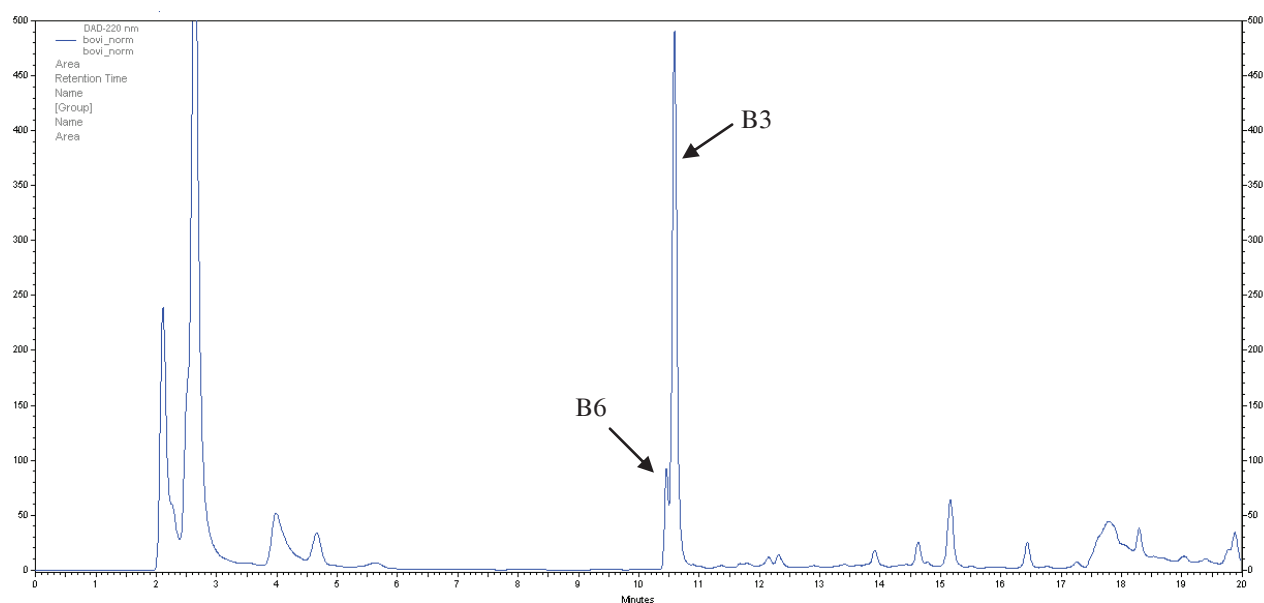


Figura 42 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. $\lambda=220$ nm.

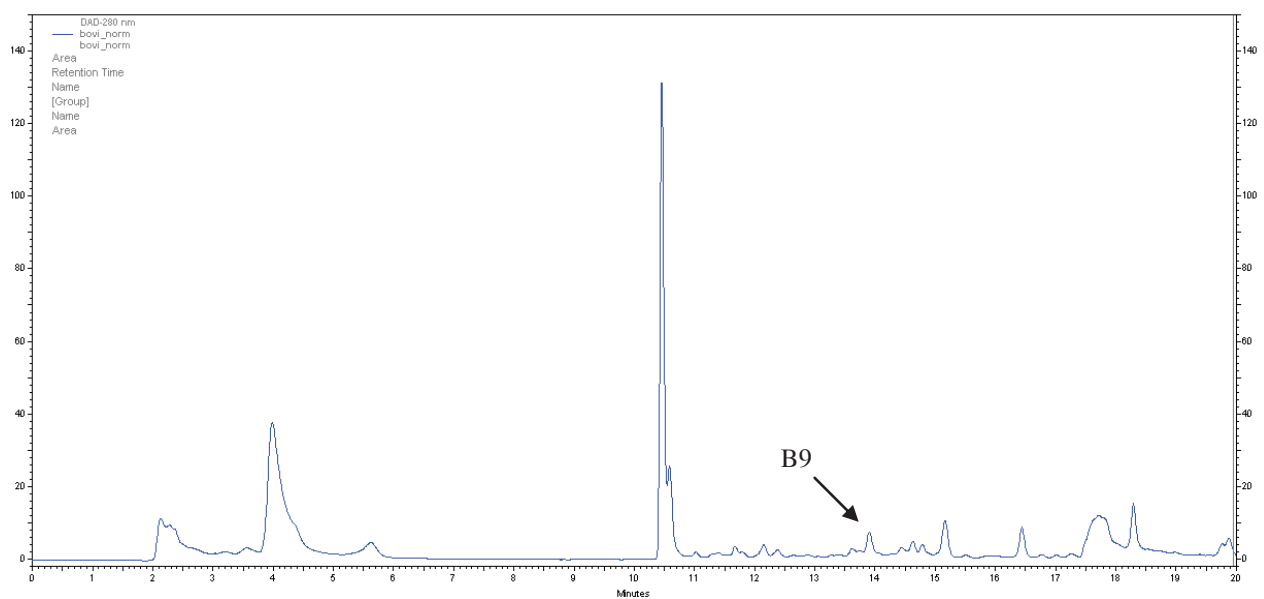


Figura 43 - Cromatograma obtido na análise T=4 do suplemento com vitaminas e minerais. $\lambda=280$ nm.

Anexo VII- Cromatogramas dos padrões das vitaminas lipossolúveis

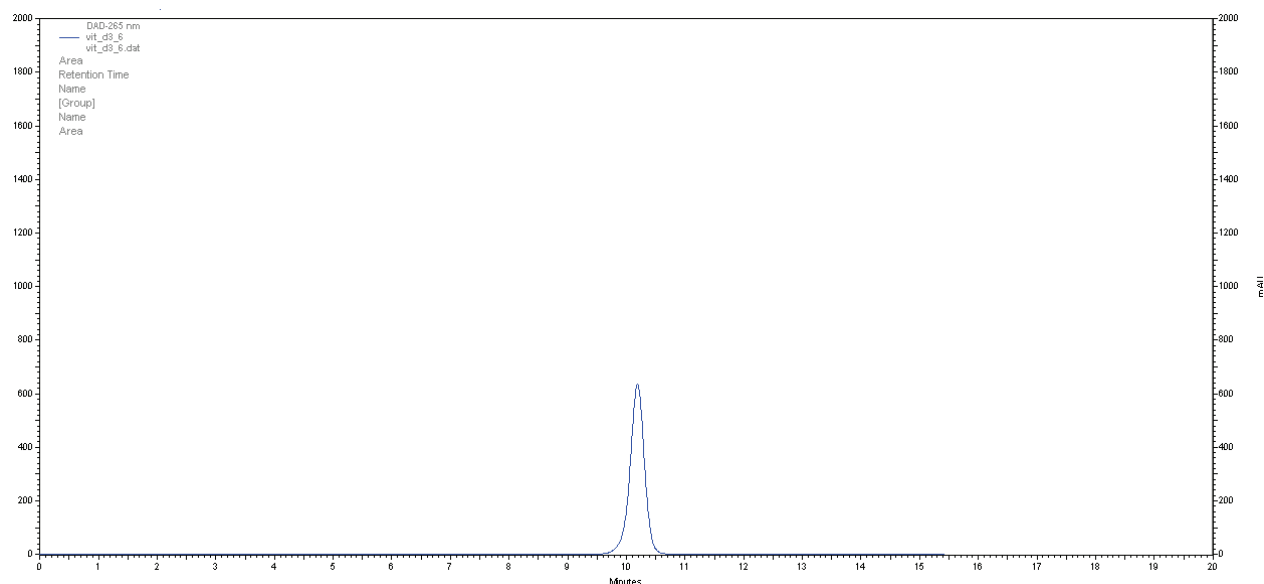


Figura 44- Cromatograma representativo do padrão da vitamina D3. $\lambda=265$ nm

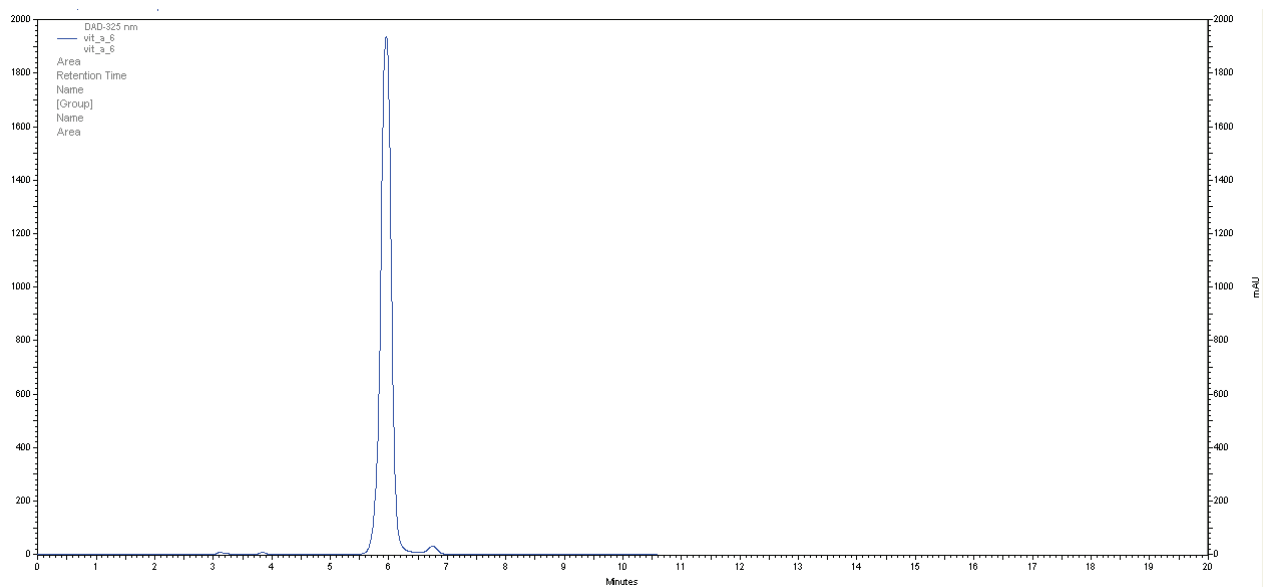


Figura 45- Cromatograma representativo do padrão da vitamina A. $\lambda=325$ nm

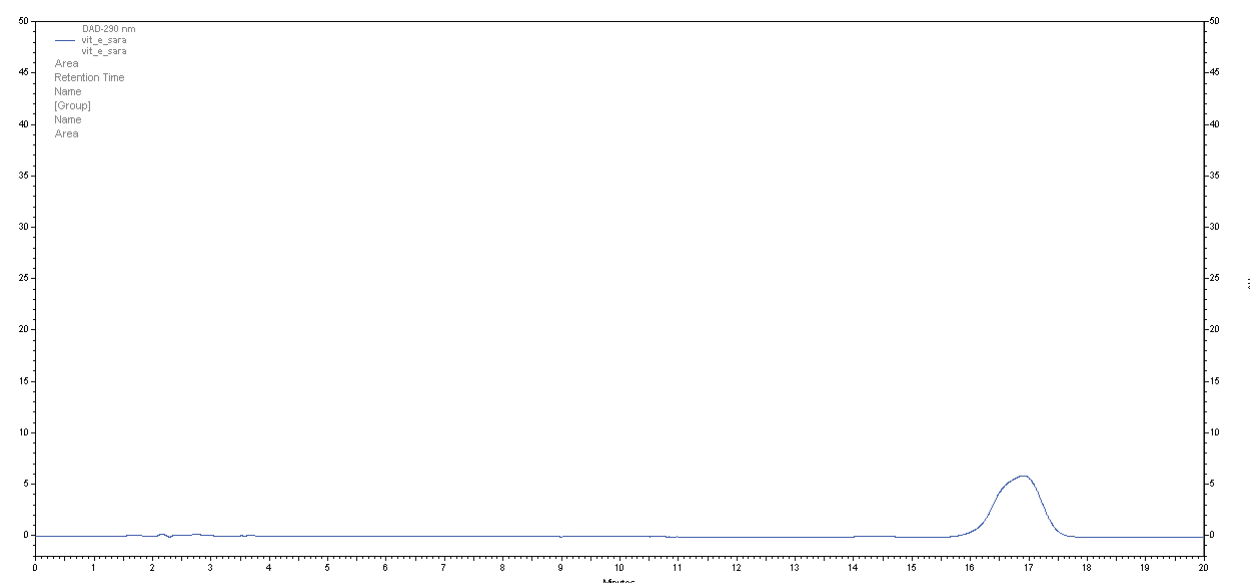


Figura 46 - Cromatograma representativo do padrão da vitamina E. $\lambda=290$ nm

Anexo VIII - Cromatogramas da análise do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=0

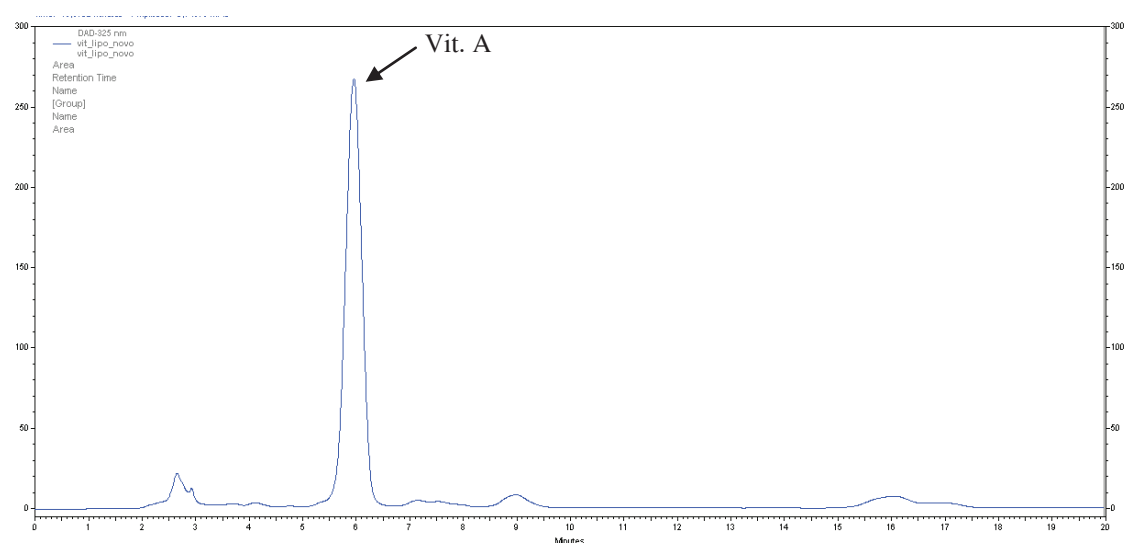


Figura 47- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitamina lipossolúveis. $\lambda=325$ nm

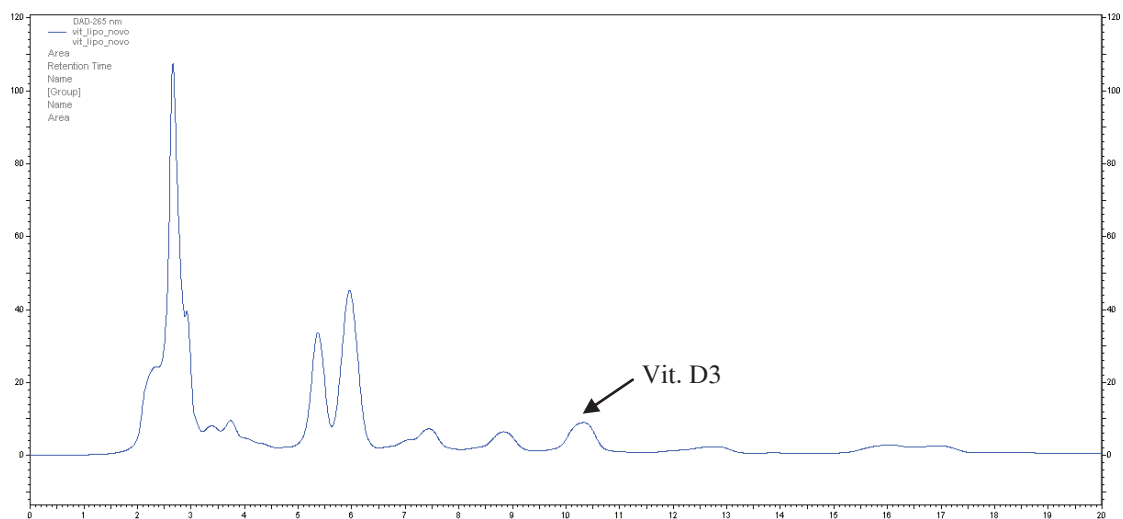


Figura 48- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=265 nm

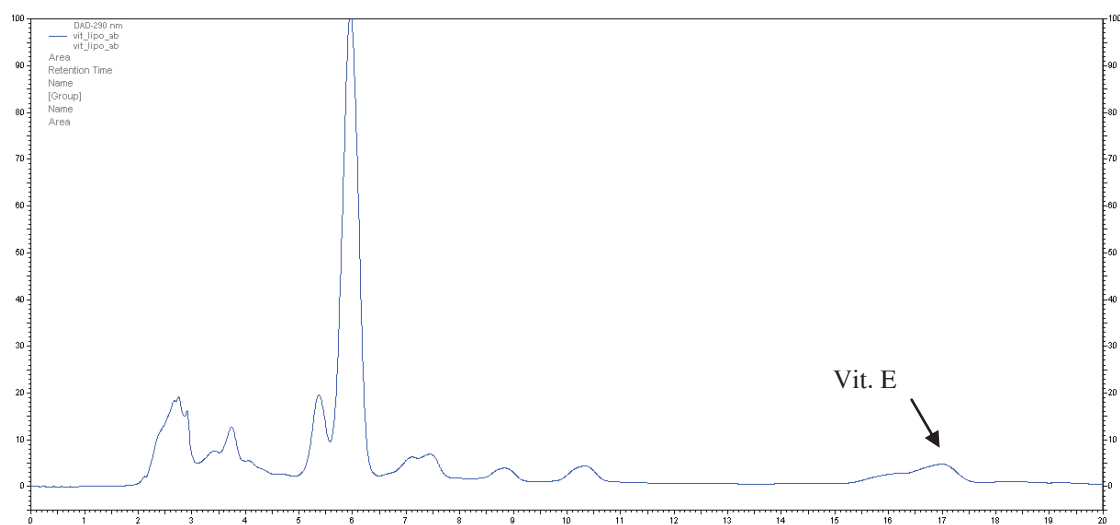


Figura 49- Cromatograma obtido na análise T=0 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=290 nm

Anexo IV- Cromatogramas da análise do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=1

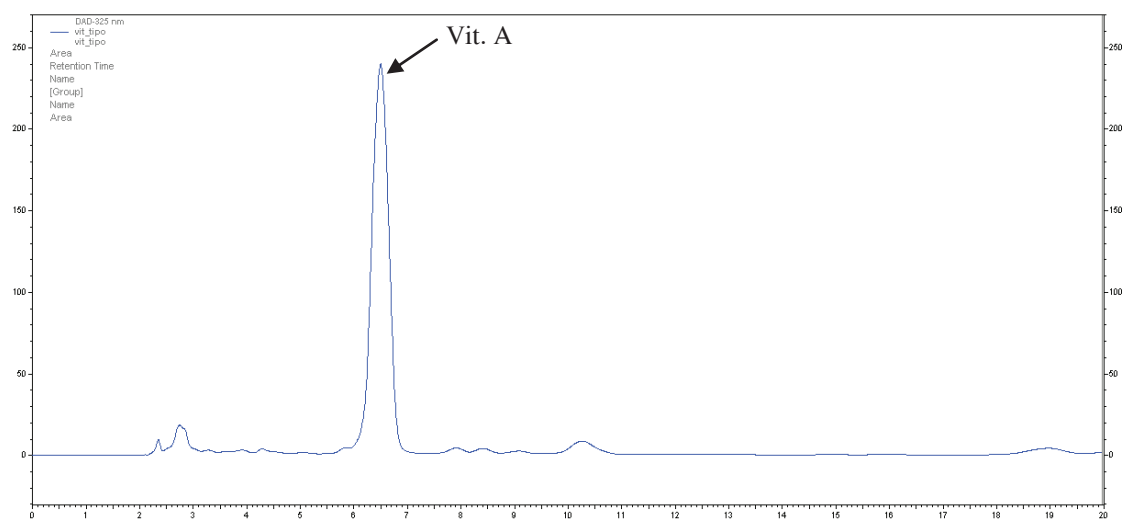


Figura 50- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=325 nm

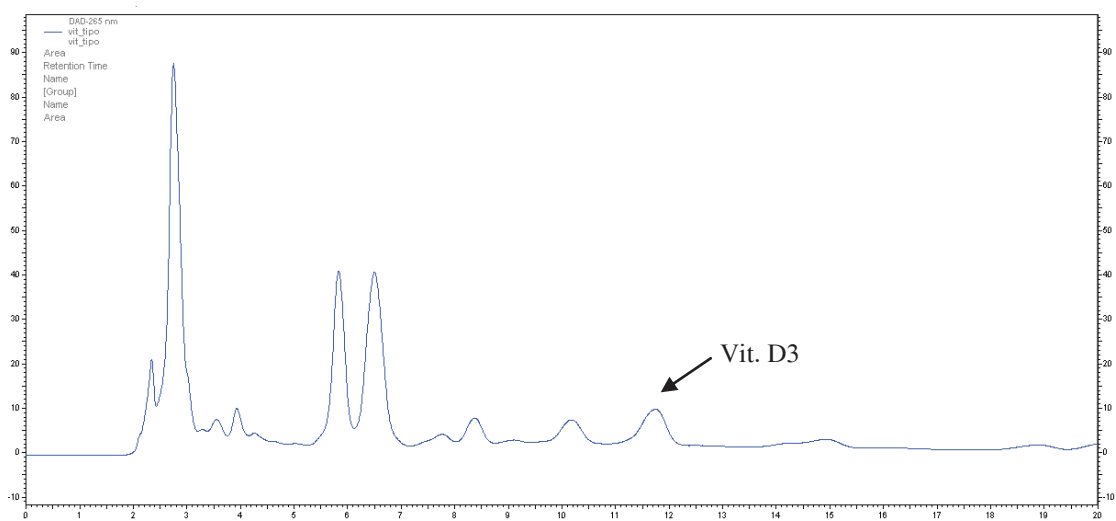


Figura 51- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=265 nm

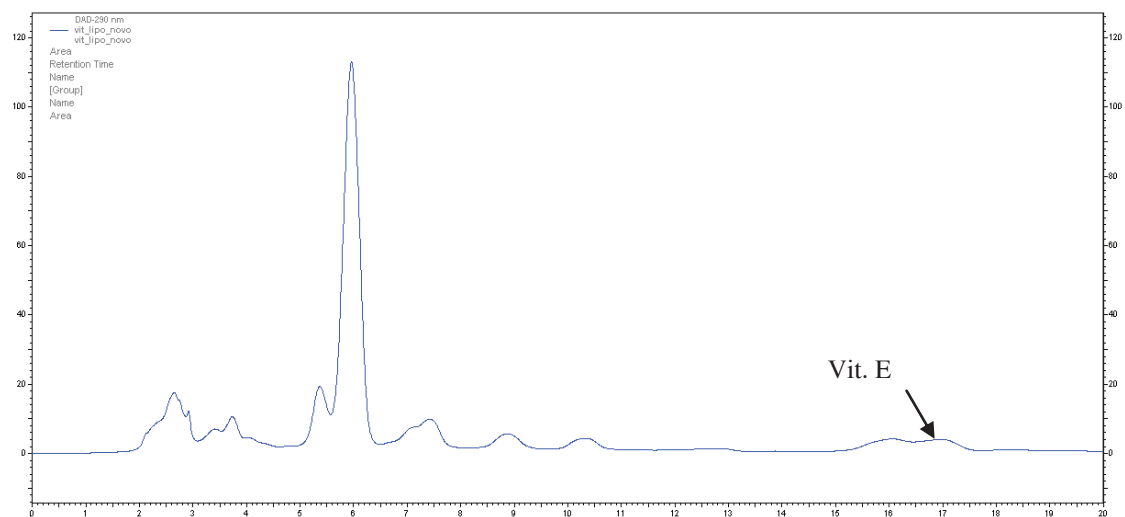


Figura 52- Cromatograma obtido na análise T=1 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=290 nm

Anexo V - Cromatogramas da análise do suplemento com vitaminas lipossolúveis em T=2

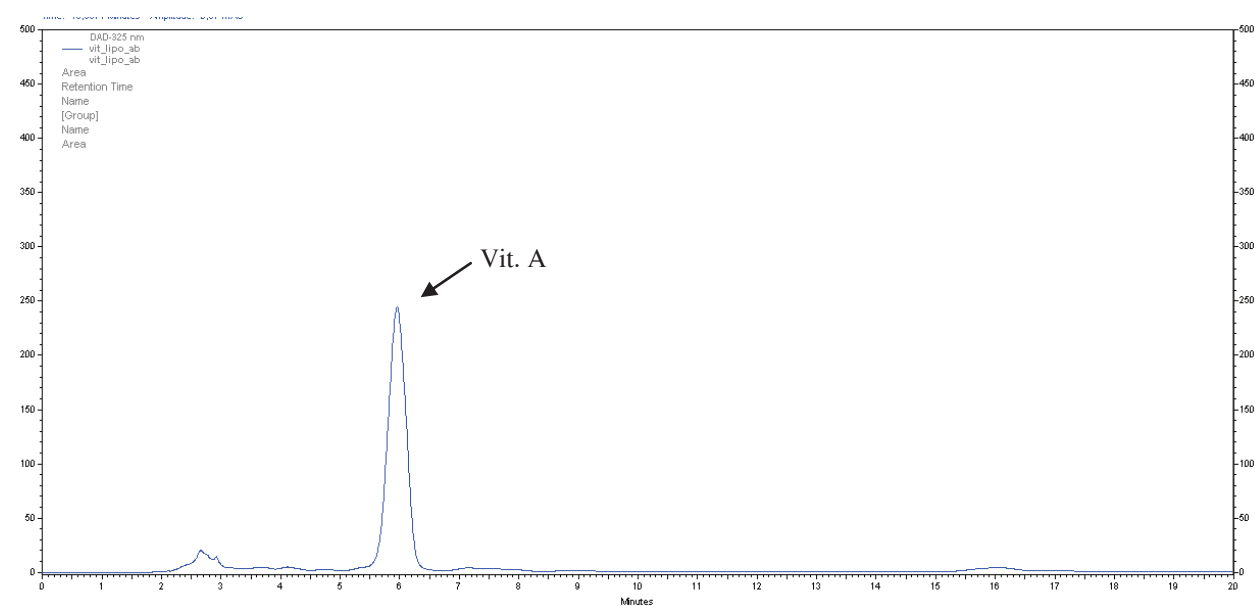


Figura 53- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=325 nm

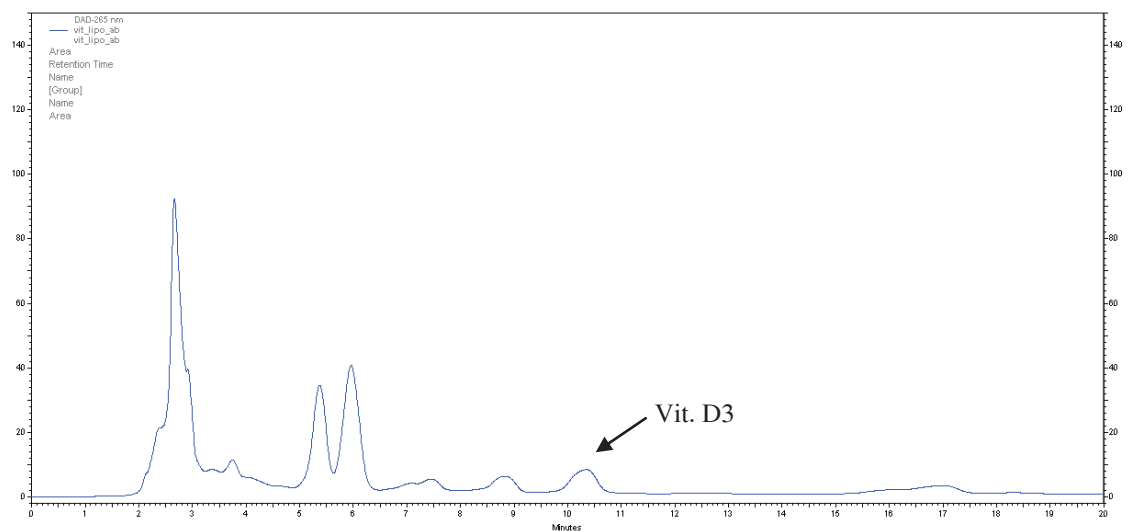


Figura 54- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=265 nm

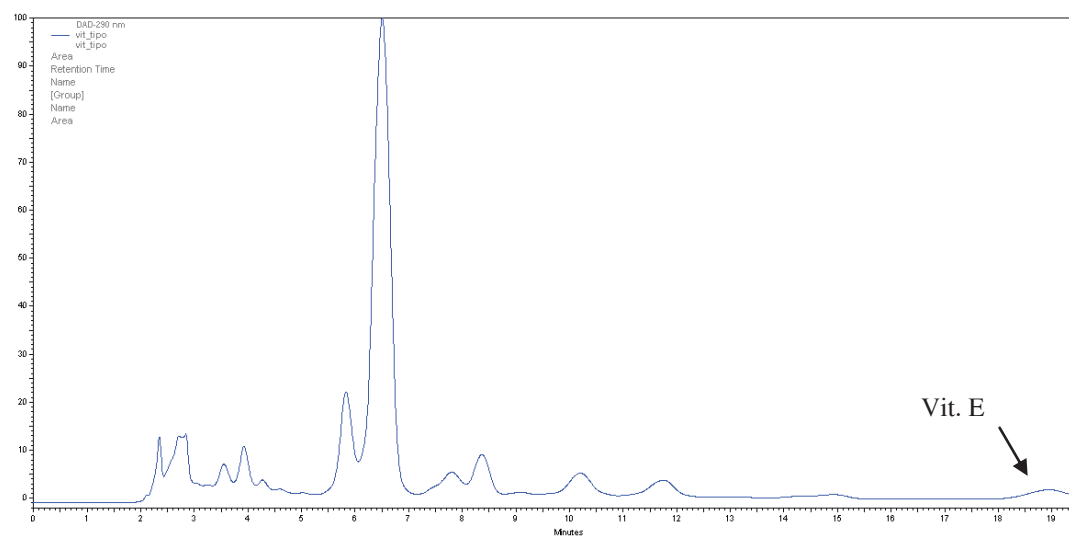


Figura 55- Cromatograma obtido na análise T=2 do suplemento com vitamina lipossolúveis. □=290 nm